

EZYMAR GOMES CAYANA

(Cirurgião-Dentista)

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTERMITENTE DO PTH (1-34) NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATAS EXPOSTAS À FUMAÇA DE CIGARROS.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Clínicas Odontológicas, área de Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Enilson Antônio Sallum

Co-orientador: Prof. Dr. João Baptista César Neto

Piracicaba/SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

C317e Cayana, Ezymar Gomes.
Efeito da administração intermitente do PTH (1-34) na
periodontite experimental em ratas expostas à fumaça de cigarros
/ Ezymar Gomes Cayana. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.

Orientadores: Enilson Antônio Sallum, João Baptista César
Neto.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Periodontia. 2. Hormônio paratireóideo. 3. Tabaco 4.
Osteoclastos. I. Sallum, Enilson Antônio. II. César Neto, João
Baptista. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Effect of Intermittent Administration PTH(1-34) on periodontitis
in rats exposed to cigarette smoking inhalation

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Periodontics. 2. Parathyroid hormone.

3. Tobacco. 4. Osteoclasts

Área de Concentração: Periodontia

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Enilson Antonio Sallum, Bruno César de Vasconcelos
Gurgel, Claudio Mendes Pannuti, Karina Gonzales Silverio Ruiz, Marcelo
Rocha Marques

Data da Defesa: 14-06-2010

Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 14 de Junho de 2010, considerou o candidato EYZMAR GOMES CAYANA aprovado.

Prof. Dr. ENILSON ANTONIO SALLUM

Prof. Dr. BRUNO CÉSAR DE VASCONCELOS GURGEL

Prof. Dr. CLAUDIO MENDES PANNUTI

Profa. Dra. KARINA GONZALES SILVERIO RUIZ

Prof. Dr. MARCELO ROCHA MARQUES

“Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende.”

Guimarães Rosa

Dedico este trabalho, com muito amor...

Aos meus pais, Elisio e Josefa, que sempre estiveram comigo, me apoiando e incentivando durante todo o meu trajeto de vida, mas principalmente por terem me transmitido exemplos de fé, coragem e amor. O apoio incondicional de vocês me moveu para que eu chegasse até aqui.

Ao meu irmão, Elyomar, por toda a contribuição dada, e por ter me ajudado nessa conquista.

À minha amada avó Paulina, pelo amor maior que pude sentir.

OBRIGADO!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me iluminado e permitido que eu terminasse com êxito e alegria todas as etapas dessa tese e por saber que em ti posso sempre confiar.

Ao Prof. Dr. Enilson Antônio Sallum, por ter oportunizado à minha entrada na Faculdade de Odontologia de Piracicaba, por ter aceito ser o meu orientador e seguir em frente comigo, superando os desafios e permitindo o meu crescimento pessoal e profissional. Obrigado pela confiança e pelo seu exemplo de profissionalismo e seriedade.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu diretor, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, pela estrutura oferecida para esta etapa importante da minha formação e a todos os funcionários que trabalham arduamente para manter tudo em ordem.

Ao Prof. Dr. Jacks Jorje Júnior, coordenador geral dos cursos de pós-graduação da FOP/UNICAMP.

À Prof^ª. Dr^ª. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia, coordenadora do curso de pós-graduação em Clínica Odontológica da FOP/UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Marcelo Ferraz Mesquita, chefe do departamento de Prótese e Periodontia.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

A Faepex, pelo auxílio para desenvolvimento da Pesquisa.

Ao Programa de Estágio de Docente, PED – FOP/UNICAMP, por ter me dado a oportunidade de colaborar mais efetivamente nas atividades docentes da disciplina de Periodontia junto ao meu orientador, Prof. Dr. Enilson Antônio Sallum.

Ao Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum, um exemplo de bom professor, bom homem. Agradeço a oportunidade de ter vivenciado algumas nobres experiências de vida, profissionalismo e cidadania com o senhor.

Ao Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Junior, pelo exemplo de pesquisador.

Ao Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati, pela atenção e cuidado sempre dispensados e pela contribuição na execução deste trabalho.

À Eliete Marin, por ser uma amiga e uma profissional dedicada em atender sempre bem.

À Regina, atual secretária da área de Periodontia, sempre atenciosa.

À Mariana, com quem divido este trabalho, com seu indispensável trabalho no laboratório no processamento histológico.

À Wanderley, Fábio e Flor, funcionários do Biotério, pelos cuidados com os animais e com todos os passos para a etapa mais árdua deste trabalho.

Aos colegas de Pós-Graduação, pelo entusiasmo e companheirismo: Ana Paula, Tatiana Meulmann, Fernanda Velasco, Mirella Lindoso, Mônica Grazieli, Lucas Queiroz, Hugo, Maria Fernanda, Wagner, Mauro, Renato, Fabrícia Suaid, Beatriz Bezerra, Daniela Feitosa, Liana Linhares, Fernanda Ribeiro, Thaisangela Rodrigues, Cris Salmon, Daia Peruzzo e Karina Ruiz.

As minha amigas de trabalho no Biotério, Liana, Mirella, Mônica e Beatriz, pela disponibilidade e toda a energia positiva depositada durante a maior parte desse trabalho.

Um agradecimento especial à Mirella, minha alma gêmea nesse doutorado e que ficará para a vida inteira.

Aos professores, João Baptista César-Neto e Marcelo Marques, pela dedicação à pesquisa e por estarem sempre comigo nas mais diversas etapas desta tese.

Aos amigos e Funcionarios da área de Histologia: Gustavo, Cidinha, Marcelão, Denise e Eliene, pela disponibilidade e apoio sempre dispensados.

À banca de qualificação, professores Cristiane Salmon, Daiane Peruzzo e Márcio Zafallon Casati, pelas valiosas sugestões neste trabalho.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste empreendimento, minha tese de doutorado.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar histológica e histoquimicamente a influência da inalação da fumaça de cigarros (IFC) e da administração intermitente de PTH 1-34 sobre a perda óssea alveolar na região de furca em ratas submetidas a periodontite experimental induzida por meio de ligaduras. Animais foram aleatoriamente distribuídos nos grupos: 1 – placebo (veículo) controle (n=11); 2- IFC + placebo (n=15); 3- PTH 1-34 (n=10); 4 – IFC + PTH 1-34 (n=15). Dentes controlaterais, não receberam ligaduras e serviram como controle. Após 60 dias com ligaduras, os animais foram sacrificados. A avaliação histométrica foi realizada quantificando a área de perda óssea na região da bifurcação e a análise histoquímica por meio de reação de fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP). Os dados coletados foram analisados estatisticamente utilizando a análise de variância ANOVA e o teste Tukey ($\alpha=5\%$). Nos dentes com ligaduras, uma análise intergrupo revelou aumento estatisticamente significativo da perda óssea como resultado do modelo de periodontite induzida quando o grupo 2 foi comparado com os grupos 1, 3 e 4 respectivamente ($p<0,05$). O número de células marcadas positivamente pelo TRAP na superfície linear da crista óssea demonstrou um aumento significativo no número de osteoclastos para o grupo 2 quando comparado com os grupos 1, 3 e 4, respectivamente ($P<0,05$). Dentro dos limites do presente estudo, pode-se concluir que o PTH 1-34 na ausência ou presença de IFC pode reduzir significativamente a perda óssea resultante da periodontite experimental induzida por ligaduras.

Palavras-chaves: PTH 1-34, Ligadura, inalação da fumaça de cigarros, Periodontite.

ABSTRACT

The aim of the present investigation was to histologically and histoquimically evaluate, in an animal model (rats), the influence of cigarette smoke inhalation (CSI) and intermittent administration of PTH in rodents would block the alveolar bone loss when a ligature-induced periodontitis is used. Animals were randomly assigned in groups: 1 – placebo (vehicle) Control-ligated (n=11); 2 – CSI + placebo- ligated (n=15); 3 – PTH-treated ligated (n=10); 4 – CSI + PTH-treated ligated (n=15). Contralateral teeth were unligated to serve as controls. After 60 days with ligatures, the animals were killed. The histometric avaluete determined the area between the bone crest and cementum surface in the furcation regions of teeth and the number of cells positive for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). The date were statistically analysed using ANOVA and Tukey's test ($\alpha=5\%$). At the ligated sites, intergroup analysis revealed significantly increased the bone loss resulting from ligature-induced periodontitis when group 2 compared with group 1, 3 and 4, respectively ($P<0,05$). The number of TRAP-Positive cell in the linear surface of the bone crest showed an increase for the group 2 compared with the group 1, 3 and 4, respectively ($P<0,05$). Whithin the limits of the present study, it can be concluded that PTH in the absence or presence of CSI may be minimize significantly the bone resorption associated with periodontitis.

Key-Words: PTH 1-34, Ligatures, Cigarette Smoke Inhalation, Periodontitis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1	O papel do Fumo na Patogênese da Doença Periodontal	5
2.2	Fumaça de cigarro: Componentes e principais características	7
2.3	Fumaça de cigarro: Estudos <i>in vitro</i>	10
2.4	Fumaça de cigarro: Estudos <i>in vivo</i>	16
2.5	Fumaça de cigarro: Estudos Clínicos e Epidemiológicos	20
2.6	Consumo de Cigarros: administrando o problema e minimizando seus efeitos	26
2.7	Paratormônio : Fisiologia e Mecanismo de Ação	27
2.7.1	Uso Clínico do PTH (1-34)	28
2.7.2	Estudos que comparam o uso da Teriparatida <i>versus</i> outros anti-reabsortivos	29
2.9.3	Doença Periodontal em Ratos	32
3	PROPOSIÇÃO	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	Características da amostra	34

4.2 Delineamento Experimental	34
4.3 Metodologia de Exposição à Fumaça	36
4.4 Sedação e Anestesia	37
4.5 Colocação das Ligaduras	37
4.6 Preparo histológico e calibração do examinador	40
4.7 Avaliação Histométrica	40
4.8 Análise histoquímica	41
4.9 Análise Estatística	41
5 RESULTADOS	43
6 DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXO	74

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal, cujo fator etiológico primário é o biofilme dental, caracteriza-se por períodos de destruição dos tecidos periodontais e períodos de remissão destes ciclos destrutivos, sendo esta doença uma das grandes responsáveis pela perda dental na população adulta (Page & Schroeder, 1982; Tew *et al.*, 1989). O grau de destruição tecidual produzido pela doença depende da interação entre a agressão das bactérias e os seus produtos frente à resposta individual do hospedeiro (Genco, 1992).

Diversos fatores têm sido investigados em relação a sua capacidade de modificar a resposta do hospedeiro (Nunn, 2003; Johnson *et al.*, 2007). Entre eles encontra-se o consumo de cigarros como um fator de risco para as doenças periodontais (Van Dyke *et al.*, 2005). Diversos estudos *in vitro* (Ramp *et al.* 1991, Kamer *et al.* 2006, Coppe *et al.* 2008), em animais (Benatti *et al.*, 2003, César Neto *et al.* 2004; 2005, Nogueira-Filho *et al.* 2007), epidemiológicos (Tomar e Asma, 2000, Susin *et al.* 2004, Zitzmann *et al.* 2008), e clínicos (Yamamoto *et al.* 2005, César-Neto *et al.* 2006), documentaram os efeitos nocivos da fumaça de cigarro e seus componentes sobre os tecidos periodontais.

O tabagismo e seus efeitos na saúde da população tem sido amplamente discutidos e divulgados na literatura médica. Há uma forte correlação do hábito de fumar com doenças cardiovasculares (Prugger *et al.* 2008), doenças vasculares periféricas (Aronow *et al.* 1994, Aurebach *et al.* 1996, U.S. Department of Health and Human Services, 2004, Rosemberg, 2004, Fielding *et al.* 1998), doença obstrutiva pulmonar crônica (Hogg & Timens, 2008), bronquite crônica, enfisema pulmonar e câncer de pulmão (Department of Health and Human Services, 1998, 2004, Rosemberg, 2004, Rennard *et al.* 2006), parto prematuro e síndrome da morte súbita infantil (U.S. Department of health and human services, 2004, Rosemberg, 2004, Pendlebury *et al.* 2008, Shea & Steiner, 2008), impotência sexual (Rosemberg, 2004, Natali *et al.* 2005, Kupelian *et al.* 2007, Millet *et al.* 2006), cânceres de laringe, esôfago, garganta, boca e pâncreas e acidente vascular cerebral (Ockene & Miller, 1997, Department of Health and Human Services, 1998, 2004, Rosemberg, 2004).

Dentre as alternativas para inibir o consumo de cigarros na população fumante, assim como evitar que jovens e adultos passem a fumar ou ainda para que ex-fumantes não reincidam, programas de prevenção e tratamento são estimulados pelos órgãos públicos

competentes. Dentre as formas de prevenção, destacam-se as imagens e mensagens impressas nos contra-rótulos dos cigarros comercializados legalmente no Brasil e das propagandas na mídia informando dos prejuízos inerentes ao tabagismo. Da mesma forma, para pacientes fumantes, dependentes da nicotina, um tratamento médico individualizado se põe como uma real possibilidade para a cessação do hábito vicioso de fumar. Entretanto, mesmo com o tratamento médico especializado ainda há muita dificuldade em se conseguir que o paciente realmente pare definitivamente de fumar.

Dados de uma revisão sistemática, publicada pela Cochrane, avaliou o efeito da terapia de reposição nicotínica com a cessação do hábito de fumar, e apontou que a taxa de abandono do fumo é em média 60%, e que embora os níveis mais intensos de apoio e aconselhamento possam ser benéficos no sentido de facilitar o abandono do tabagismo, esta não é essencial para o sucesso da terapia de reposição nicotínica - TRN. (Stead *et al*, 2008). Estudos disponíveis indicam que a TRN é uma intervenção eficaz em alcançar a abstinência do fumo sustentado para os fumantes que não têm nenhuma intenção ou são incapazes de tentar uma saída abrupta. A maioria das provas, no entanto, vem de estudos com apoio e monitoramento de comportamento regular, e não está claro se a terapia de substituição da nicotina, sem contato regular seria tão eficaz. (Moore *et al*, 2009).

Em virtude da relevância do efeito do consumo de cigarros na patogênese das doenças periodontais, estudos têm sido realizados na tentativa de melhor elucidar os efeitos do fumo sobre o periodonto, (Nociti *et al*, 2000; César-neto *et al*, 2005; 2006; Nogueira-Filho *et al*, 2007) para melhor compreender os fenômenos da remodelação óssea a partir do hormônio paratireoideano (PTH), conhecido também como teriparatida. (Barros *et al*, 2003; Supervía *et al*, 2006; Sneve *et al*, 2008; Marques *et al*, 2009).

Em pacientes com osteoporose, o uso intermitente do PTH aumentou o volume e espessura do osso trabecular após administração semanal de PTH via subcutânea, após um ano de tratamento (Miki *et al*, 2004). Mulheres osteopênicas na pós-menopausa tiveram aumentos nos marcadores de remodelação óssea, colágeno tipo I nas porções N e C-Terminal e nos níveis séricos de Osteocalcina em resposta a administração de PTH 1-34 (Glover *et al*, 2009). Num outro estudo randomizado, prospectivo, duplo-cego em mulheres na pós-menopausa com fratura de rádio, a administração de 20 microgramas de PTH 1-34

diferiu significativamente do grupo placebo e acelerou o processo de cicatrização da fratura (Aspenberg *et al*, 2009).

A teriparatida (hormônio da paratireóide recombinante humano) é um agente anabólico aprovado para o tratamento de pacientes com alto risco de fraturas. Seu mecanismo de ação difere dos outros agentes antireabsortivos. Enquanto, os outros agentes reabsortivos diminuem o turnover ósseo, teriparatida aumenta o turnover ósseo, estimulando a diferenciação dos osteoblastos (File *et al*, 2009). Ele liga-se com afinidade semelhante à do PTH endógeno ao receptor ligado à proteína G. A teriparatida estimula a ação dos osteoblastos, que são as células responsáveis pela formação óssea, aumentando assim a formação de osso novo. Existem evidências de que este estímulo ocorra através da inibição da apoptose destas células e pelo estímulo à passagem de pré-osteoblastos a osteoblastos, aumentando o número destes (Jilka *et al*, 1999).

O PTH (1-34) quando administrado em humanos, não aumenta a incidência de tumores e não apresenta efeitos mutagênicos ou tóxicos (Morley *et al.*, 1997; Mohan *et al.*, 2000; Neer *et al.*, 2001) ou qualquer outro efeito colateral, dados estes confirmados por estudos envolvendo aproximadamente 1000 pacientes, tratados com PTH (1-34) por 3 anos (Horwitz *et al.*, 2000).

O medicamento é contra-indicado para pacientes com risco de desenvolverem osteosarcoma e com elevação inexplicada da fosfatase alcalina, como doença de Paget ou que foram submetidos à radiação nos ossos. O PTH também é contra-indicado para crianças e jovens adultos além de pacientes com hiperparatireoidismo e hipercalcemia. O risco de Osteosarcoma é incerto, e apenas um caso foi relatado nos Estados Unidos. (File *et al*, 2009).

Na área odontológica, estudos revelaram que a administração intermitente de PTH (1-34) diminui significativamente a perda óssea promovida pela periodontite induzida por ligaduras em ratos. (Silva *et al*. 2005).

Num estudo histomorfométrico com doença periodontal induzida, ratos que receberam PTH não apresentaram nenhuma perda óssea quando comparado àqueles tratados com placebo, os quais tinham mais perda óssea e mais inflamação, confirmados pelo maior número de leucócitos polimorfonucleares (Barros *et al*, 2003)

Em vista da ausência de estudos em modelo animal que avaliem de maneira sistemática o efeito do PTH (1-34) na presença dos componentes da fumaça de cigarro, o presente estudo se propôs a investigar a influência do PTH (1-34), sobre a perda óssea alveolar em ratas submetidas à periodontite experimental e expostas à inalação da fumaça de cigarros, por meio de uma avaliação histométrica e histoquímica na região inter-radicular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O papel do Fumo na Patogênese da Doença Periodontal

O consumo do tabaco desempenha um papel importante no desenvolvimento e progressão da doença periodontal apresentando maior prevalência e também maior gravidade da doença, quando comparados a indivíduos não fumantes. (Haber *et al*, 1993).

Bergstron, em 2004, num artigo de revisão afirma que o tabagismo é o principal fator de risco associado à doença periodontal destrutiva crônica e que nenhum outro fator conhecido pode coincidir com a força do hábito de fumar em causar danos ao periodonto. Os efeitos nocivos manifestam-se por interferir com as reações vasculares e imunológicas, bem como, ao comprometer as funções de suporte dos tecidos periodontais. A característica típica do tabagismo associado a doença periodontal é a destruição dos tecidos de suporte dos dentes, com os sinais clínicos decorrentes da perda óssea, perda de inserção, formação de bolsa e, eventualmente, a perda do dente.

Há consenso de que os fumantes apresentam maior perda óssea e perda de inserção, bem como as freqüências mais acentuadas de bolsas periodontais do que os não-fumantes. Além disso, a perda do dente é mais extensa em fumantes. (Preber, 1986; Faddy *et al*, 2000; Van der Weyden *et al*, 2001; Calsina *et al*, 2002)

O fumo, assim, aumenta consideravelmente o risco para a doença periodontal destrutiva. Dependendo da definição da doença e a exposição ao fumo, o risco é de 5 a 20 vezes mais elevado para um fumante em comparação com um não-fumante (Hyman *et al*, 2003).

O resultado do tratamento periodontal é menos favorável em fumantes. (Papantonopoulos, 1999). Embora os estudos em longo prazo sejam raros, todos são unânimes em concordar que as falhas de tratamento e recidiva da doença são observadas principalmente em fumantes (Bergstron *et al*, 1992; Magnusson *et al*, 1994). Esse argumento é válido, independentemente da modalidade de tratamento, sugerindo que o tabagismo pode interferir com um resultado esperado normal, após sucessivas terapias periodontais.

Investigação sobre o fumo revelou que fatores ambientais e estilo de vida estão envolvidos no aparecimento e progressão da doença. Sendo o resultado do fumo, partes da doença periodontal destrutiva uma característica comum com cerca de 40 outras doenças ou distúrbios. Como consequência, a doença periodontal deve ser considerada como uma doença sistêmica, da mesma forma como a doença cardíaca ou doença pulmonar. Assim, a doença periodontal destrutiva crônica em fumantes é iniciada e conduzida pelo fumo. (Barnes, 2000)

De Heens *et al*, 2009, investigou a produção de citocinas linfocitárias T representando subpopulações Th1 e Th2 em fumantes e não fumantes. Amostras de sangue foram coletadas de 30 pacientes tratados de periodontite (12 fumantes) e 24 indivíduos saudáveis (12 fumantes). Culturas de células de sangue total foram estimuladas e interferon (IFN)-gama e interleucina (IL) -13 foram medidos nos sobrenadantes de cultura, representando os tipos 1 e 2 subpopulações Th, respectivamente. Dados não ajustados mostrou que os fumantes tinham mais linfócitos e níveis mais elevados de IFN-gama e IL-13, independentemente de ser paciente periodontal. No entanto, em uma análise multivariada, o aumento da produção de IFN-gama não foi significativamente explicada pelo fumo, enquanto a maior produção de IL-13 foi fortemente explicado pelo hábito de fumar (21%, $p < 0,001$). Este estudo sugeriu que a atividade aumentou Th e, especificamente, um perfil Th2 elevado em fumantes pode constituir um risco para pacientes fumantes que pode induzir a conversão da estabilidade em progressão da doença periodontal. Esse fenômeno pode ser igualmente importante em outras condições, em que o tecido conjuntivo e perda óssea são as marcas da fisiopatologia da doença.

A doença periodontal é uma patologia multifatorial apresentando o biofilme bacteriano como fator etiológico primário. No entanto, a manifestação e a progressão da periodontite são influenciadas por diversos fatores, incluindo características do indivíduo, fatores sociais e comportamentais, fatores sistêmicos, perfil genético, anatomia dentária, composição microbiológica do biofilme dentário e a resposta individual do hospedeiro frente ao desafio microbiano e a fatores de risco associados. (Kornman *et al*, 1997).

A influência do consumo de cigarros sobre a doença periodontal tem sido amplamente discutida nas últimas décadas. Uma maior incidência e severidade de perda de

inserção clínica foram relatadas por diversos estudos avaliando pacientes fumantes. A maneira pela qual os componentes do tabaco promovem este efeito ainda não está estabelecida, todavia, estudos recentes sugerem que o consumo de cigarros influencia na expressão de citocinas inflamatórias e em moléculas que favorecem a degradação tecidual. (Kamer *et al*, 2006)

O sistema de defesa determina a susceptibilidade de cada indivíduo à doença. Os neutrófilos são a primeira linha de defesa do organismo. Os neutrófilos de fumantes apresentam-se aumentados e com sua ação prejudicada, por uma menor quimiotaxia, fagocitose e aderência. (Apatzidou *et al*, 2005; MacFarlane *et al*, 1992). Além disso, tem sido demonstrado que a nicotina tem um efeito apoptótico nesta primeira linha de defesa, o que pode ser importante para a patogênese da doença periodontal, uma vez que a morte prematura destas células de defesa pode facilitar a contaminação bacteriana. (Mariggio *et al*, 2001).

Tem sido demonstrado que o fumo aumenta a atividade proteolítica dos neutrófilos com a liberação de metaloproteinases da matriz e elastase associadas a destruição tecidual durante a doença periodontal. (Palmer *et al*, 2005)

2.2 Fumaça de Cigarro: Componentes e principais características

A fumaça de cigarro é uma mistura complexa de gases e partículas que possui mais de 4000 substâncias potencialmente tóxicas, incluindo 43 substâncias cancerígenas (Haverstoch & Mandracha, 1998). A fase gasosa é composta principalmente por monóxido e dióxido de carbono, nitrogênio, oxigênio, cianeto de hidrogênio, acroleína, acetaldeído, formaldeído (SILVERSTEIN, 1992). Já a fase particulada tem como constituintes principais nicotina, água, nitratos, nitrosaminas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HANES *et al*, 1991)

A composição da fumaça varia de acordo com o tipo de tabaco e também com a preparação, como compactação do fumo, comprimento da coluna, características do filtro de papel. (RAMOS & RAMOS, 1998).

Quando a fumaça é inalada para dentro dos pulmões, muitos dos seus constituintes tóxicos têm partículas cujo tamanho é suficiente para afetar diretamente os cílios das células do epitélio respiratório ou ultrapassar a barreira ciliar e penetrar na corrente sanguínea, alcançando outras regiões do organismo. Individualmente e em combinação, essas substâncias podem alterar as condições necessárias para a reparação tecidual (SILVERSTEIN, 1992). O primeiro relato dos efeitos deletérios do consumo de cigarros sobre a cicatrização foi publicado em 1977 por MOSELY & FINSETH, que observaram uma pior cicatrização das feridas na mão de um fumante com arteriosclerose. A partir daí, diversos trabalhos têm relacionado o tabagismo com dificuldades na reparação tecidual (JONES & TRIPLETT, 1992; TONETTI *et al.*, 1995; ROSEN *et al.*, 1996; SCABBIA *et al.*, 2001).

A nicotina, o monóxido de carbono e o cianeto de hidrogênio são os elementos da fumaça de cigarro mais comumente relacionados a um pior processo de reparo (SILVERSTEIN, 1992; HAVERSTOCH & MANDRACHIA, 1998). Outros componentes da fumaça do cigarro, como a acroleína e o acetaldeído, têm mostrado, *in vitro* um efeito prejudicial na proliferação e adesão de células importantes para o processo de cicatrização, os fibroblastos (CATTANEO *et al.*, 2000). Autores como SILVERSTEIN (1992) relatam, ainda, que outros constituintes da fumaça de cigarro também podem ter efeitos negativos sobre a reparação tecidual.

A nicotina é a razão primária pela qual as pessoas consomem produtos do tabaco, possui alto poder viciante e seu uso crônico pode causar dependência psicológica e física (ROBBERS *et al.*, 1997). Ao ser consumida, produz estimulação primária transitória seguida de depressão persistente de todos os gânglios nervosos simpáticos e parassimpáticos. Entre seus efeitos estão: taquicardia, estado de alerta, diminuição dos reflexos profundos e tônus muscular esquelético (GENNARO, 1998), além de promover uma sensação de disposição durante as primeiras horas do dia e de relaxamento, principalmente em situações de estresse (ROBBERS *et al.*, 1997). Presente nas folhas secas do tabaco (*Nicotiana tabacum*) na forma de malatos ou citratos (ROBBERS *et al.*, 1997) é classificada como um alcalóide, inodoro e incolor. Em contato com o ar adquire cor escura e odor característico do cigarro (RAMOS & RAMOS, 1998). Alguns de seus efeitos podem

prejudicar os processos de reparo, como a liberação de catecolaminas que diminuem a perfusão tecidual e a alteração no metabolismo dos fibroblastos (TIPTON & DABBOUS, 1995), além da diminuição da proliferação de hemácias, macrófagos e fibroblastos (SHERWIN & GASTWIRTH, 1990).

O monóxido de carbono (CO) é um gás incolor, inodoro, insípido e não irritante que resulta da combustão incompleta da matéria orgânica (KLAASSEN, 1996). É o poluente mais encontrado na atmosfera inferior e um grande número de mortes acontece anualmente devido a sua inalação (KLAASSEN, 1996). Corresponde a 4 % da fumaça de cigarro (HAVERSTOCH & MANDRACHIA, 1998) e sua toxicidade se deve à alta afinidade pela hemoglobina. Esse gás se liga à hemoglobina nos capilares pulmonares e forma um composto altamente estável. Nessa forma, a hemoglobina não transporta oxigênio, pois ambos os gases reagem com os mesmos grupamentos da molécula (KLAASSEN, 1996). Como a afinidade pelo CO é cerca de 220 vezes maior que pelo O, o CO apresenta seus efeitos mesmo em baixas concentrações (KLAASSEN, 1996). Indivíduos normais têm níveis de CO ligado à hemoglobina que variam de 0,5 a 1,0 %, já nos indivíduos fumantes esses níveis podem variar de 1 a 20%. A redução na capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue é proporcional à quantidade de hemoglobina ligada ao CO. Entretanto, a quantidade de oxigênio disponível para os tecidos é ainda menor pela influência inibitória da carboxihemoglobina na dissociação de qualquer molécula de oxihemoglobina ainda disponível (KLAASSEN, 1996). Esse conjunto de fenômenos pode diminuir a quantidade de oxigênio presente nos tecidos em reparação, gerando reflexos negativos nessas áreas (SHERWIN & GASTWIRTH, 1990).

Outro componente da fumaça de cigarro que pode influenciar negativamente a reparação tecidual é o cianeto de hidrogênio, substância altamente tóxica utilizada em diversas áreas como inseticida e até como gás letal em execuções. O cianeto tem uma afinidade muito alta pelo ferro no estado férrico. Quando absorvido, reage prontamente com o ferro trivalente da citocromo oxidase na mitocôndria. A respiração celular é inibida resultando em acidose láctica e hipóxia citotóxica (KLAASSEN, 1996). Essas alterações enzimáticas na respiração celular podem prejudicar o processo de reparação dos tecidos (MOSELY & FINSETH, 1977).

Os aldeídos são formados pela combustão incompleta de hidrocarbonetos e pela oxidação dessas moléculas pela luz solar (KLAASSEN, 1996). Existem diversos tipos de aldeídos. Os mais freqüentes na atmosfera são o formaldeído e a acroleína, presentes também na fumaça de cigarro. Outro aldeído muito comum na fumaça de cigarro é o acetaldeído. O formaldeído pode causar irritação da mucosa nasal, ocular e vias aéreas superiores. A acroleína é muito mais tóxica que o formaldeído e é uma das substâncias que confere a qualidade irritante da fumaça do cigarro. Tal substância produz diminuição da freqüência respiratória e aumento da resistência das vias aéreas superiores. Um estudo recente (CATTANEO *et al.*, 2000) observou que a acroleína e o acetaldeído alteram a proliferação e adesão dos fibroblastos gengivais *in vitro* e sugere que esses efeitos podem ocorrer *in vivo*. Poggi *et al.* (2002) investigaram os efeitos da acroleína e do acetaldeído sobre os fibroblastos gengivais. Os autores verificaram que essas substâncias exerceram um efeito citotóxico sobre os fibroblastos, resultando em perda da capacidade de adesão e proliferação. Esses efeitos poderiam prejudicar a manutenção, a integridade e remodelação do tecido conjuntivo bucal.

2.3 Fumaça de cigarros: Estudos *in vitro*

Alguns trabalhos *in vitro* têm demonstrado que a fumaça de cigarro e seus componentes apresentam efeitos negativos em culturas de células ósseas. RAMP *et al.* (1991) estudaram o efeito da nicotina sobre culturas de células tipo osteoblasto. Os resultados mostraram que a nicotina inibiu a atividade da fosfatase alcalina e a síntese de colágeno num padrão dose-dependente. Não foram observados efeitos da nicotina sobre as proteínas não-colágenas e observou-se uma estimulação da síntese de DNA.

YUHARA *et al.* (1999) avaliaram a influência da nicotina sobre o metabolismo ósseo de culturas de células. Para esse estudo foram utilizadas 3 linhagens de células: clonais osteogênicas da calvária de ratos (ROB-C26), clonais pré-osteoblásticas da calvária de camundongos (MC3T3-E1) e células tipo osteoblasto retiradas de uma co-cultura de células da medula óssea de ratos. Os resultados revelaram que a nicotina estimulou a deposição de Ca e a atividade da fosfatase alcalina nas células ROB-C26. Por outro lado, ambas as atividades foram diminuídas nas células MC3T3-E1. Observou-se ainda que a

nicotina afetou a diferenciação das células tipo osteoblasto. Os autores dessa pesquisa concluíram que a nicotina pode ter um efeito crítico sobre o metabolismo ósseo.

LIU *et al.* (2001) realizaram um experimento avaliando a ação direta da fumaça de cigarro sobre células osteoprogenitoras humanas. Para isso, células da medula óssea foram isoladas de indivíduos normais e cultivadas em monocamadas e em um gel tridimensional de colágeno tipo 1. Em ambas as condições de cultura, a fumaça de cigarro inibiu a proliferação das células osteoprogenitoras num padrão dose-dependente. Observou-se também que a fumaça de cigarro impediu a diferenciação das células osteoprogenitoras em células tipo osteoblasto e que as culturas em monocamadas estavam mais susceptíveis aos efeitos adversos da fumaça de cigarro.

Andreou *et al.* (2004) cultivaram células derivadas da região medular do fêmur de ratos e, em seguida, as expuseram a hidrocarbonetos presentes na fumaça de cigarro, associados ou não a lipolissacarídeos (LPS) de *Porphyromonas gingivalis*. Os resultados demonstraram que estas substâncias isoladas tinham efeitos deletérios sobre a osteogênese. Entretanto, houve um efeito sinérgico entre os hidrocarbonetos e o LPS reduzindo a formação de nódulos minerais em até nove vezes. Esses resultados explicariam, em parte, porque os fumantes com doença periodontal têm maior perda óssea e um pior prognóstico após o tratamento.

Gullihorn *et al.* (2005) compararam os efeitos da nicotina e de outros componentes da fumaça de cigarro sobre osteoblastos. Linhagens de osteoblastos MC3T3-E1 foram expostas a diversas doses de nicotina e a condensados da fumaça de cigarro. Foram analisadas a atividade de fosfatase alcalina, síntese de colágeno, síntese total de proteína e proliferação celular. Os resultados demonstraram que a nicotina estimulou o metabolismo das células ósseas de forma dose-dependente por meio do aumento da atividade de fosfatase alcalina e redução da síntese total de proteína e da síntese de colágeno. Essas respostas foram notadas mesmo com doses de nicotina (12.5 ng/mL) comparáveis à metade da dose de nicotina circulante em fumantes. Condensados de fumaça, com concentrações de nicotina equivalentes, reduziram todos os índices de atividade metabólica. A proliferação celular foi estimulada tanto pela nicotina (20-25%) como pelos condensados de fumaça

(38-46%). Os resultados sugerem que a nicotina age como estimulante direto da atividade celular metabólica, enquanto que os condensados da fumaça possuem um efeito inibitório.

Tanaka *et al.* (2005) investigaram o efeito da nicotina na proliferação celular, atividade de fosfatase alcalina (ALPase), formação de nódulos mineralizados e na expressão de matriz-metaloproteinases em células humanas de osteosarcoma. A formação de nódulos mineralizados foi suprimida pela nicotina no dia 10 da cultura e o conteúdo de cálcio, no dia 14. A atividade de ALPase, a expressão de colágeno tipo I e osteopontina também diminuíram na presença da nicotina depois de 5, 10 e 14 dias de cultura, respectivamente. Em contrapartida, a quantidade de sialoproteína óssea aumentou durante os 14 dias de cultura com nicotina. Esses resultados sugerem que a nicotina suprime a osteogênese através da diminuição na atividade de ALPase e na produção de colágeno tipo I pelos osteoblastos.

Novamente, Tanaka *et al.* (2006) avaliaram o efeito da nicotina e do LPS sobre a expressão do fator macrofágico estimular de colônia (M-CSF), da osteoprotegerina (OPG) e prostaglandina E2 (PGE2) em osteoblastos e o efeito indireto da nicotina e do LPS sobre a formação de osteoclastos. Os osteoblastos humanos foram tratados tanto com nicotina isolada quanto com nicotina associada à LPS. A expressão gênica e protéica de M-CSF e OPG foram determinadas por PCR real-time e ELISA, respectivamente. A expressão de PGE2 foi determinada por ELISA. A expressão de osteoclastos foi estimada por fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico (TRAP) pelo receptor solúvel do ativador NF-Kappa (RANKL). A expressão de M-CSF e PGE2 aumentou em células cultivadas com nicotina e LPS, quando comparadas àquelas cultivadas apenas com nicotina. A expressão de OPG aumentou no estágio inicial da cultura com nicotina e LPS, mas diminuiu no estágio final. O meio contendo M-CSF e PGE2 produzido pelos osteoblastos humanos tratados com nicotina e RANKL solúvel, aumentou a marcação de osteoclastos TRAP positivos, comparados àquele produzido pelo tratamento somente de nicotina. Os resultados sugerem que a nicotina e o LPS estimulam a formação de osteoclastos por meio de um aumento na produção de M-CSF e PGE2 e essa associação produz um maior estímulo quando comparado o efeito da nicotina isolada.

Outro estudo de 2006, realizado por Katono *et al*, 2006, avaliou o efeito da nicotina sobre a expressão de matriz-metaloproteínas (MMPs), inibidores teciduais de MMPs (TIMPs), sistema ativador de plasminogênio, incluindo o ativador de plasminogênio tecidual (tPA), ativador de plasminogênio do tipo urokinase (uPA), e inibidor tipo 1 do ativados de plasminogênio (PAI-1), receptor de nicotina alfa-7, e gene c-fos. Foi analisado ainda o efeito do antagonista de nicotina D-tubocurarine na expressão de MMP-1. O tratamento com nicotina acarretou a expressão de MMP-1, 2, 3, e 13, mas não de MMP-14. Na presença de nicotina, a expressão de uPA, PAI-1, ou TIMP-1, 2, 3, ou 4 não mudou ao longo do período de cultura, enquanto que a expressão de PA aumentou significativamente depois do dia 7. A nicotina também aumentou a expressão do receptor de nicotina alfa7 e do gene c-fos. Os resultados sugerem que a nicotina estimula o turnover da matriz óssea por meio do aumento da produção de tPA e MMP-1, 2, 3, e 13, desequilibrando o processo de formação e reabsorção de matriz óssea ao longo do processo tardio.

Kamer *et al*. (2006) investigaram duas formas pelas quais os tabaco pode influenciar o metabolismo ósseo: a proliferação de osteoblastos induzida pela nicotina e a secreção de citocinas pelos osteoblastos induzida pela nicotina. Para tanto, usaram nesse estudo dois modelos de células osteoblásticas, um derivado da calvária de camundongos e o outro, osteoblastos humanos. Imuno-ensaios foram usados para avaliar a proliferação celular e secreção de interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Os resultados revelaram que a nicotina induziu estimulação e inibição nos dois modelos de células. Nos osteoblastos humanos, os efeitos proliferativos e inibitórios foram doador-dependentes. A secreção de IL-6 mostrou diferentes padrões nos diferentes tipos celulares. Nos osteoblastos originários de camundongos, a nicotina aumentou significativamente a secreção de IL-6. Nos osteoblastos humanos, as células derivadas de um indivíduo não responderam à nicotina. No entanto, na segunda amostra a nicotina aumentou a secreção de IL-6. Nessas células, a nicotina ainda induziu a um aumento na secreção de TNF- α . Os resultados sugerem que a nicotina afeta o metabolismo ósseo modulando a proliferação celular e a secreção de IL-6 e TNF- α e ainda constituem uma possível explicação para as diferenças na taxa de perda óssea entre indivíduos tabagistas.

Muitos estudos também têm sido realizados com o objetivo de observar os efeitos da fumaça de cigarro e seus componentes sobre os fibroblastos. Essas células têm uma função crítica no metabolismo do tecido conjuntivo, sendo importantes para os tecidos normais e em reparação. De maneira geral, as culturas de fibroblastos apresentam-se como uma monocamada de células fusiformes, superfície lisa, alinhamento paralelo e mínima sobreposição (TIPTON & DABBOUS, 1995; JAMES *et al.*, 1999). Já as culturas submetidas à ação da nicotina mostram células com arranjo desorganizado, sobreposições, anatomia alterada, vacuolização do citoplasma, redução do conteúdo protéico e destruição das membranas celulares (RAULIN *et al.*, 1988; TIPTON & DABBOUS, 1995; TANUR *et al.*, 2000).

PEACOCK *et al.* (1993) também avaliaram a influência da nicotina em culturas de fibroblastos gengivais. Entretanto, seus resultados foram conflitantes com os citados anteriormente. Observou-se nesse estudo que altas concentrações de nicotina não produziram nenhum efeito nas culturas e que, em baixas concentrações, a nicotina estimulou a reprodução celular. Os autores sugeriram que a nicotina não seria a única substância envolvida nas respostas teciduais provocadas pelo tabaco e que outros agentes presentes na fumaça poderiam ser responsáveis pelos efeitos negativos.

JAMES *et al.* (1999) investigaram a ação da nicotina e do seu metabólito primário, a cotinina, sobre culturas de fibroblastos do ligamento periodontal humano (FLP). Os resultados revelaram que a nicotina inibiu a adesão e o crescimento dos FLP em todas as concentrações estudadas ($>1\text{mg/ml}$ e $>0,5\text{ mg/ml}$). Já a cotinina parece inibir o crescimento e adesão dos FLP na maior concentração estudada ($10\text{ }\mu\text{g/ml}$), porém esse resultado não apresentou diferença estatisticamente significativa.

CATTANEO *et al.* (2000) pesquisaram a ação de dois outros componentes da fumaça de cigarro, a acroleína e o acetaldeído, sobre os fibroblastos gengivais humanos (FGH). FGH derivados de indivíduos saudáveis e sem inflamação gengival foram utilizados nessa pesquisa. Os resultados mostraram que as duas substâncias inibiam o crescimento e a proliferação dos FGH de maneira dose-dependente e que esses efeitos eram reversíveis, quando ambas as substâncias eram removidas do meio de cultura, após 3 dias de exposição.

Diante desses resultados, viu-se a importância de estudar a influência de outros componentes da fumaça de cigarro. Carnevalli *et al* (1998) verificaram os efeitos de extratos de fumaça de cigarro (CSE) sobre a habilidade de culturas de fibroblastos em mediar a contração de gel de colágeno. Os autores verificaram que a fumaça de cigarro inibiu a contração do gel mediada pelos fibroblastos e que essa inibição foi atribuída, pelo menos em parte, aos componentes voláteis da fumaça de cigarro e em parte pela diminuição da produção de fibronectina.

Rota *et al* (2001) avaliaram o efeito de componentes da fase volátil da fumaça de cigarro, a acroleína e o acetaldeído, sobre o citoesqueleto de fibroblastos gengivais (FGH). Para tanto, foram utilizados HGF obtidos de indivíduos saudáveis com gengiva não inflamada. As células foram incubadas em três diferentes concentrações de acroleína e acetaldeído. Os autores verificaram que ambas as substâncias produziram efeitos similares, resultando numa inibição da adesão dos HFGs de forma dose-dependente. O dano ao citoesqueleto consistiu em alteração da forma celular. Os resultados sugerem que a acroleína e o acetaldeído dificultam a adesão celular em função de sua capacidade de ligação ao citoesqueleto celular.

Cattaneo *et al* (2000) e Poggi *et al* (2002) pesquisaram a ação da acroleína e do acetaldeído sobre os fibroblastos gengivais humanos (FGH). FGH derivados de indivíduos saudáveis e sem inflamação gengival foram utilizados nessa pesquisa. Os resultados mostraram que as duas substâncias inibiam o crescimento, proliferação, viabilidade e adesão dos FGH de maneira dose-dependente. Além disso, alterações no citoesqueleto, como a destruição de microtúbulos e filamentos de actina, também foram observadas.

Wang *et al* (2003) analisaram o efeito da interação da densidade celular e extrato de fumaça de cigarro (CSE) sobre a contração de fibroblastos em gel de colágeno. Os níveis de fator de crescimento transformador beta 1 (TGFβ1), fibronectina, protaglandina E2 (PGE2), e mRNA de (TGFβ1) foram quantificados. CSE na concentração de 5 e 10% inibiu a contração de fibroblastos de baixa densidade (1×10^5 cell/ml), e somente a concentração de 5% aumentou a contração de culturas de alta densidade ($3-5 \times 10^5$ cells/ml). CSE também inibiu a produção de fibronectina e TGF-β1 nas culturas de baixa densidade, mas estimulou a produção de fibronectina nas culturas de alta densidade. TGF-beta1 ativo foi

detectado somente nas culturas de alta densidade e encontrou-se marcadamente aumentado pela concentração de 5% de CSE.

Katz *et al* (2005) testaram a hipótese de que a nornicotina aumenta a expressão do receptor (RAGE) de produtos avançados finais da glicolização (AGE) na gengiva de fumantes e de que desencadeia os efeitos pro-inflamatórios dos AGEs pelo estímulo da secreção de citocinas e de oxigênio reativo, que diretamente causam destruição dos tecidos periodontais. Culturas de células gengivais humanas foram expostas a 1 microM de nornicotina por 72 horas. Após esse pré-tratamento com nornicotina, algumas células foram tratadas também com AGE, que foi gerado com nornicotina. As células controle não foram expostas nem a nornicotina nem a AGE. As células tratadas com nornicotina tiveram a expressão de RAGE aumentada. Os resultados sugerem que a nornicotina pode induzir a expressão de RAGE em tecidos gengivais. Os autores sugerem que esses dados suportam a hipótese de que o RAGE tem um importante papel na progressão da doença periodontal exacerbada pelo tabagismo.

Teughels *et al* (2005) avaliaram o efeito da nicotina, da cotinina e de extratos da fumaça do cigarro (CSE) sobre a suscetibilidade das células epiteliais de serem colonizadas por periodontopatógenos. Os autores verificaram que essa susceptibilidade foi alterada tanto para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* como para *Porphyromonas gingivalis* diante da nicotina, cotinina e CSE.

Coppe *et al* (2008) avaliaram o efeito de extratos da fumaça do tabaco sobre fibroblastos orais humano. Os autores demonstraram que os extratos de fumaça do tabaco elevaram os níveis de oxigênio intracelular reativo, dano oxidativo ao DNA e quebra das fitas duplas de DNA, num padrão dose-dependente.

2.4 Fumaça de cigarro: Estudos *in vivo*

Em 1993, BROULIK & JARAB estudaram a influência da nicotina sobre a concentração óssea mineral em ratos. Foram incluídos no estudo 32 ratos, divididos em 4 grupos iguais e submetidos ao seguinte tratamento: A-controle, B-nicotina via água de bebedouro, C-castração e D-castração e nicotina via água de bebedouro. Após 56 dias, os

animais foram sacrificados e o fêmur analisado. Os resultados revelaram que os animais dos grupos B e D (grupos que receberam nicotina) apresentaram uma significativa redução na densidade óssea e no componente ósseo mineral, quando comparados aos outros grupos.

Boyne & Herford (1995) realizaram um estudo em que a formação óssea subperiosteal foi estimulada. Os autores observaram que os animais expostos à fumaça de cigarro produziram menos tecido ósseo que os animais controle. Os animais que receberam nicotina exibiram 35% menos crescimento ósseo que os animais submetidos à fumaça do cigarro e 50% menos que os animais controle.

UENG *et al.* (1997) estudaram o efeito da fumaça de cigarro sobre o reparo ósseo de tíbias de coelhos submetidas a um procedimento cirúrgico de alongamento. Foram utilizados 38 animais divididos em dois grupos (teste: fumaça de cigarro e controle). A tíbia direita de cada animal foi alongado 5 mm. Cinco animais de cada grupo foram sacrificados 4, 6 e 8 semanas pós operatórias para os testes de resistência mecânica, e 1 animal de cada grupo foi sacrificado 2, 4, 6 e 8 semanas pós-operatórias, para as análises histológicas de reparo ósseo. Os resultados demonstraram que os animais submetidos à fumaça de cigarro obtiveram menor resistência no teste mecânico e que, histologicamente, a reabsorção do tecido de granulação, formação óssea e remodelação foi prejudicada.

Num estudo seguinte de metodologia similar, UENG *et al.* (1999) avaliaram o efeito da fumaça de cigarro sobre a densidade óssea mineral em coelhos após um procedimento cirúrgico de alongamento de tíbia. Nesse estudo, foram utilizados doze coelhos Nova Zelândia que foram divididos em dois grupos (Teste: fumaça de cigarro e Controle). Os animais foram sacrificados seis semanas após a realização das cirurgias. Os resultados mostraram que a fumaça de cigarro diminuiu a resistência à torção e a densidade mineral dos animais do grupo teste.

HOLLINGER *et al.* (1999) avaliaram o efeito da nicotina sobre o reparo ósseo em ratos que receberam enxerto ósseo autógeno. Para isso, foram criados defeitos bilaterais (4 mm de diâmetro) na região parietal de sessenta animais, nos quais o lado esquerdo servia como leito doador e era deixado cicatrizar espontaneamente, e o lado direito recebia o enxerto. Parte da amostra recebeu nicotina em três concentrações distintas via água do

bebedouro (12,5 mg/ml, 25 mg/ml e 50 mg/ml) e foi comparada com animais que não receberam nicotina. Os resultados revelaram que não houve diferenças no reparo ósseo dos defeitos que receberam enxerto autólogo, entretanto a nicotina influenciou negativamente o reparo dos leitos doadores.

Em 1999, FUNG *et al.* Investigaram o efeito da nicotina sobre o osso e os hormônios calcitropicos de ratas adultas velhas. Foram utilizados no experimento trinta animais divididos em três grupos: A-solução salina fisiológica (n=9), B- nicotina numa dosagem de 3mg/kg/dia através de bomba osmótica (n=10) e C – nicotina numa dosagem de 4,5mg/kg/dia através de bomba osmótica (n=11). Após três meses de administração de nicotina, os resultados mostraram que os animais dos grupos B e C apresentaram uma diminuição no armazenamento de vitamina D. Além disso, os ratos do grupo C mostraram uma menor área vertebral, menor densidade mineral e uma taxa de aposição óssea endocortical mais baixa quando comparados aos do grupo A.

Stefani *et al* (2002) avaliaram a influência da administração de nicotina sobre o reparo ósseo ao redor de implantes de titânio com superfície tratada por óxido de alumínio. Foram utilizados trinta e dois coelhos que receberam dois implantes em cada tibia (um de superfície usinada e o outro jateado com óxido de alumínio). Embora tenha sido observada uma tendência numérica de que a nicotina influenciou negativamente o contato ósseo para os implantes de superfície usinada, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Os autores concluem que a nicotina não parece influenciar o reparo osso ao redor de implantes de titânio.

Saldanha *et al* (2004) avaliaram em cães o efeito da administração de nicotina (2 mg/kg, três vezes ao dia, por quatro meses) em defeitos ósseos tratados com regeneração óssea guiada (ROG). Os resultados demonstraram que a nicotina foi capaz de influenciar a área e a densidade do osso neoformado, quando comparados aos do grupo controle, que não recebeu nicotina. Os autores sugeriram que a nicotina pode influenciar, mas não impedir o reparo ósseo em defeitos tratados por RGO.

Oda *et al* (2004) investigaram a influencia da fumaça de cigarro sobre os discos intervertebrais. Os autores verificaram que os níveis de citocinas inflamatórias (IL-1 β) no

grupo fumante foram significativamente maiores do que no grupo não fumante. Além disso, houve maior decomposição da atividade de condrócitos.

Lee *et al* (2005) verificaram o efeito da inalação de fumaça de cigarro na fusão de vértebras de coelhos. Os resultados demonstraram que a fumaça de cigarro retardou o reparo das vértebras. El-Zawawy (2006) estudaram o efeito da fumaça de cigarro sobre o reparo ósseo de tíbias fraturadas. Os autores verificaram a expressão de colágeno tipo II, como marcador de matriz de cartilagem e de antígeno de proliferação celular nuclear (PCNA) para medir a proliferação no sítio da injúria. Também foi executada análise histomorfométrica para quantificar áreas de calos cartilagosos e não cartilagosos. Os resultados revelaram que a fase condrogênica do reparo da fratura das tíbias foi retardada pela fumaça de cigarro.

Benatti *et al* (2005) avaliaram a influência da inalação de fumaça de cigarro (IFC) e da nicotina sobre a regeneração espontânea dos tecidos periodontais e observaram que a IFC reduziu significativamente a densidade do novo osso e o preenchimento do defeito. Além disso, não ocorreu formação de novo cimento na região da raiz instrumentada. Os autores concluem que a fumaça de cigarro pode influenciar negativamente a regeneração periodontal em ratos.

César-Neto *et al* 2006 investigaram em sessenta ratos Wistar, por meio de histometria a influência da inalação da fumaça de cigarro e a sua cessação sobre o osso alveolar de suporte. Os animais foram distribuídos em dos seguintes grupos: Grupo 1: animais que não foram expostos a inalação da fumaça de cigarro durante todo o período experimental (n=15); Grupo 2: 60 dias de inalação da fumaça de cigarro (n= 13); Grupo 3: 90 dias de inalação de fumaça de cigarro e 60 dias sem qualquer exposição a inalação da fumaça de cigarro; Grupo 4: 150 dias de inalação da fumaça de cigarro (n=16). Os animais do grupo 2 e 4, que inalaram fumaça por 2 e 5 meses apresentaram uma redução significativa na proporção de tecido mineralizado quando comparados aos animais do grupo 1 e 3 (controle e cessação, respectivamente) ($p>0,05$)

Nogueira-Filho (2007) investigou num modelo de doença periodontal induzida em ratos Wistar por meio de ligaduras, diferentes concentrações dos componentes de cigarro sobre a perda óssea em região de furca do primeiro molar mandibular. Os animais foram

divididos em três grupos, sendo um controle, e dois testes. O Grupo II, recebeu 1,3 mg nicotina e 15,2 mg de monóxido de carbono, enquanto o grupo 3 recebeu 0,4 mg e 5 mg, respectivamente. O estudo observou que a perda óssea encontrada nos grupos foi diretamente proporcional as diferentes concentrações dos componentes tóxicos do cigarro, sendo $5.74 \pm 0.50 \text{ mm}^2$, e $7.40 \pm 0.50 \text{ mm}^2$, e $6.51 \pm 0.50 \text{ mm}^2$ para os grupos 1, 2 e 3, respectivamente; ($p < 0.05$).

2.5 Fumaça de Cigarro: Estudos Clínicos e Epidemiológicos

O tabagismo é considerado um fator de risco reconhecido para a periodontite. É o segundo mais forte fator modificador, após o biofilme bacteriano. Este hábito está associado a duas a oito vezes mais risco de perda de inserção e óssea, num padrão dose-dependente e também dependente da definição da doença. (Grossi *et al.* 1995, Bergstron 2004, Calsina *et al.* 2002).

O NHANES III (*National Health and Nutrition Examination Survey*) é um dos maiores estudo epidemiológicos existentes. Neste estudo, Tomar & Asma (2000) analisaram a associação entre tabagismo e periodontite. Foram incluídos 12, 329 adultos com 20 anos ou mais. Os resultados demonstraram que fumantes ativos tiveram quatro vezes mais chance de ter periodontite (definida como um sítio ou mais com 4 mm de profundidade de sondagem e perda de inserção clínica), quando comparados com não fumantes, mesmo após ajustes para idade, raça ou etnia, renda e nível de educação. Fumantes pesados (consumo de 31 cigarros/ dia ou mais) tiveram maior risco que fumantes leves (consumo de 9 cigarro/dia ou menos) com risco estimado de 5,6 e 2,8 respectivamente.

Em duas populações, brasileira (Susin *et al.* 2004) e tailandesa (Torrunguang *et al.* 2005), o risco para doença periodontal severa em tabagistas pesados foi de cinco a oito vezes maior do que em não fumantes, mesmo quando ajustado o nível de placa. Adultos jovens tabagistas têm três vezes mais risco de ter doença periodontal do que não fumantes após ajuste para gênero, nível de placa e acesso a cuidado profissional (Hashim *et al.* 2001).

O tabagismo foi relacionado com menor preenchimento sanguíneo dos alvéolos dentários pós-extração e maior incidência de alveolite seca. Os autores consideraram a ação vasoconstritora da nicotina a causadora desses efeitos (Meechan *et al.* 1985). Sweet & Butler (1979) também consideraram a ação vasoconstritora da nicotina responsável pela maior ocorrência de osteíte localizada após exodontia de terceiros molares inferiores. De acordo com Esposito *et al.* (1998), a tensão de oxigênio pode influenciar o processo de formação óssea. Desta forma, um suprimento de oxigênio considerado adequado para células em repouso pode ser inadequado para as mesmas células num período de proliferação e síntese.

O desenvolvimento e progressão da doença periodontal foram relacionados com o tabagismo (Johnson *et al.* 1999, Albandar *et al.* 2000), assim como com a reabsorção da crista óssea alveolar (Bergström *et al.* 1991), agravando a redução da altura e densidade do osso alveolar em mulheres com doença periodontal, após a menopausa (Payne *et al.* 2000). Além disso, o consumo de derivados do tabaco também tem sido relacionado à perda dentária precoce, principalmente quando associado à má higiene bucal (Holme, 1994, Albandar *et al.* 2000).

Shiloah *et al.* (2000) demonstraram que indivíduos fumantes com saúde periodontal tem 18 vezes mais chances de ter o sulco gengival colonizado por periodontopatógenos, quando comparados com não fumantes, num padrão dose e tempo dependente. Haffajee & Socransky (2001) avaliaram a prevalência, proporção e níveis de espécies subgengivais em indivíduos adultos fumantes, ex-fumantes e que nunca fumaram através da técnica de *DNA-DNA hybridization*. Bactérias do complexo laranja e vermelho foram mais prevalentes no grupo de fumantes.

Liede *et al.* (1999) verificaram maior prevalência de diversas alterações bucais, como leucoplasia oral, periodontite, supuração e reabsorção óssea, menor capacidade tampão da saliva, bem como atividades proteolítica geral salivar e da matriz-metaloproteinase oito (MMP-8) mais baixas em pacientes fumantes que ex-fumantes.

O tabagismo afeta vários aspectos da resposta imune inata e adaptativa (Palmer *et al.* 2005, Ryder 2007). Incluem-se nesses aspectos alterações na função neutrofílica, na produção de anticorpos, na atividade de fibroblastos, nos fatores vasculares e na produção

de mediadores da inflamação. Fredriksson *et al.* (1999) verificaram contagem sanguínea de células brancas e de neutrófilos aumentada em fumantes. Os autores encontraram menor taxa de tripsina alfa-1 no plasma desses indivíduos. Além disso, o consumo de cigarro também reduziu a síntese de IgG, principalmente a IgG₂, dificultando a fagocitose anticorpo-dependente pelos neutrófilos. Da mesma forma, Smith *et al.* (2003) observaram maior número total de células brancas e granulócitos na circulação sistêmica de fumantes. Em contrapartida, Pauletto *et al.* (2000) encontraram um menor número de neutrófilos e de nível de elastase na cavidade bucal de fumantes com doença periodontal, quando comparados com não fumantes e ex-fumantes com a mesma condição. Os autores consideraram a possibilidade de os neutrófilos ficarem restritos aos tecidos, incapazes de migrar via sulco para a cavidade bucal, em função do efeito vasoconstritor da nicotina. No entanto, Persson *et al.* (1999) afirmaram que apesar do número reduzido de neutrófilos no fluido crevicular de fumantes, não houve diferenças entre as atividades dessas células em fumantes leves recentes com saúde gengival ou inflamação leve, quando comparados aos de não fumantes com a mesma condição gengival. A atividade dos neutrófilos foi avaliada através da produção de elastase, lactoferrina, antitripsina alfa-1, macroglobulina alfa-2 e proteínas.

Graswinckel *et al.* (2004) verificaram menores níveis de imunoglobulina G (IgG) em fumantes, quando comparados com não fumantes. Além disso, Apatzidou *et al.* (2005) constataram que fumantes apresentavam menos IgG para *Agregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a) do que não fumantes. A quantidade total de IgG₂ (Graswinckel *et al.* 2004) e de IgG₂ reativa com A.a também se mostraram reduzidas em fumantes (Tangada *et al.* 1997). A redução dessas imunoglobulinas poderia diminuir a resposta imune em fumantes.

Boström *et al.* (1998, 1999) verificaram níveis mais altos de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no fluido crevicular de fumantes com doença periodontal, quando comparados com não fumantes com as mesmas condições gengivais. Stein *et al.* (2004) analisaram os níveis de TGF- β no fluido crevicular de fumantes e fumantes com periodontite crônica através do ELISA. Os fumantes exibiram maior concentração média de

TGB- β do que não fumantes. Esses resultados poderiam explicar a aparência clínica de tecido gengival friboso.

Loos *et al.* (2004) analisaram o número de células T (CD3+) e de suas subpopulações (CD4+ e CD8+) e a capacidade proliferativa das células B (CD19+) e T na periodontite em pacientes fumantes e não fumantes. O colapso do periodonto em pacientes fumantes foi associado com altos números de células T CD3+, CD4+ e CD8+ e proliferação aumentada de células T.

César-Neto *et al* (2006) verificaram o efeito do tabagismo nos níveis de interferon gama (IFN- γ) em tecidos gengivais de indivíduos fumantes com periodontite crônica. Após realização do RT-PCR, verificou-se que o tabagismo aumentou os níveis de mRNA e de IFN- γ nos tecidos gengivais. Em 2007, César-Neto *et al.* avaliaram o efeito do tabagismo na expressão de interleucina 1a (IL-1a), interleucina 1ra (ILA-1ra), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), interleucina 10 (IL-10), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), matriz-metaloproteinase 2 e 8 (MMP-2, MMP-8) ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa B (RANKL) e osteoprotegerina (OPG) na gengiva de indivíduos com periodontite crônica severa. A expressão de genes foi avaliada por meio do PCR e a de proteínas por meio do ELISA. Os níveis de IL-1a, IL-1ra, IL-6, IL-8 e RANKL apresentaram-se mais altos nos indivíduos fumantes com doença periodontal severa, quando comparados com indivíduos saudáveis não-fumantes e com indivíduos não fumantes com as mesmas condições periodontais. Em contrapartida, os níveis de IL-10, MMP-8 e OPG foram mais baixos nos fumantes com doença periodontal severa. Buduneli *et al* (2006) compararam os níveis salivares de RANKL e OPG em fumantes e não-fumantes com doença periodontal crônica. Foram verificados ainda os níveis de cotinina na saliva dos pacientes. Os fumantes apresentaram maiores profundidades de sondagem, maior nível de inserção clínica, maiores níveis de RANKL e menores níveis de OPG, quando comparados com não fumantes. Além disso, os níveis de OPG foram correlacionados com os níveis de cotinina e com o número de cigarros fumados por ano, mesmo após realizar ajustes para idade e gênero.

Nishida *et al.* (2006) examinaram o efeito do fumo passivo nos níveis de marcadores salivares relacionados à periodontite através do ELISA. Os níveis de

interleucina 1 beta (IL-1 β), lactoferrina, albumina e aminotransferase aspartato (AST) estavam significativamente mais elevados nos fumantes passivos, quando comparados aos não fumantes. Além disso, os níveis desses marcadores, exceto a IL-1 β , estavam diminuídos nos fumantes ativos, quando comparados com fumantes passivos.

Yamamoto *et al* (2005) verificaram a relação do fumo passivo e ativo com a severidade da doença periodontal. O número de dentes com nível de inserção clínica maior ou igual 3,5 mm em fumantes ativos e passivos foi significativamente maior do que em não fumantes. O risco para periodontite em fumantes passivos foi de 2,87 (95% de intervalo de confiança; 1,05 – 7,82) e em fumantes passivos foi de 4,91 (95% de intervalo de confiança; 1,80 – 13,35).

Trikilis *et al* (1999) verificaram menor temperatura subgingival em bolsas periodontais de pacientes fumantes, e relacionaram este fato à inflamação menos intensa em função da ação vasoconstritora da nicotina sobre a circulação periférica e menor atividade celular, gerando menos calor. No entanto, Palmer *et al* (1999) não encontraram evidências que comprovassem a teoria da vasoconstrição localizada dos tecidos gengivais por ação do consumo de cigarros, sugerindo uma possível tolerância dos fumantes aos componentes vasoativos da fumaça do cigarro.

Hanioka *et al* (2000a) analisaram a tensão de oxigênio nas bolsas periodontais de fumantes e verificaram que esta foi menor, quando comparada à de não fumantes. Além disso, fumantes exibiram menor oxigenação na gengiva saudável e adaptabilidade reduzida da função vascular à inflamação gengival. Aparentemente, fumantes apresentaram disfunção da microcirculação gengival (Hanioka *et al*. 2000b). Estudos mais recentes, utilizando a fluxometria a laser Doppler (Meekin *et al*. 2000, Mavropoulos *et al*. 2003), verificaram a não alteração ou o aumento do fluxo sanguíneo gengival. No entanto, após a cessação do fumo, tanto o fluxo sanguíneo gengival como o fluido crevicular aumentaram (Morozumi *et al*. 2004). Da mesma forma, o sangramento à sondagem após a cessação do fumo também aumentou (Nair *et al*. 2003).

2.6 Consumo de Cigarros: administrando o problema e minimizando seus efeitos

O hábito de fumar está intimamente relacionado com um maior risco de doenças obstrutivas pulmonares crônicas, doenças vasculares periféricas, enfisema pulmonar, osteoporose e diabetes (WHO 2008).

Estudos têm relatado que o efeito negativo do consumo de tabaco sobre o periodonto pode ser revertido. O potencial benefício da interrupção do tabaco é mediado por vias distintas, que podem incluir: microbiota subgengival menos patogênica, recuperação da micro-circulação gengival, restabelecimento da função, metabolismo e viabilidade dos neutrófilos, resposta imunitária mais eficaz e reequilíbrio na produção local e sistêmica de citocinas (Heasman *et al*, 2006).

A interrupção do consumo de cigarros tem demonstrado um impacto positivo sobre o risco periodontal. Os fumantes apresentam um risco 4 vezes maior de apresentar doença periodontal, enquanto os ex-fumantes apresentam um risco relativo de 1,68 vezes (Tomar *et al*, 2000) .

A interrupção do consumo de cigarros também tem sido associada a melhores resultados no tratamento da doença periodontal. Haffajee & Socransky (2001) demonstraram uma maior prevalência de bactérias periodontopatogênicas do complexo laranja e vermelho em fumantes, comparativamente a ex-fumantes e não fumantes: *Eikenella nodatum*; *Fusobacterium nucleatum ss vincentii*; *Prevotella intermedia*; *Peptoestreptococcus micros*; *Prevotella nigrescens*; *Tanarella forsythensis*; *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*. Esta observação foi constatada em bolsas profundas > 4mm e pequenas < 4mm, possivelmente devido a alterações nas condições anaeróbicas da microbiota subgengival.

Fullmer *et al*, em 2009, investigaram longitudinalmente, a composição da comunidade microbiana em pacientes fumantes e em ex-fumantes que participaram de um programa de cessação do tabagismo. Amostras de placa subgengival foram coletadas no início do estudo, e 3, 6 e 12 meses pós-tratamento dos fumantes que receberam alisamento radicular e aconselhamento de cessação de fumar. Perfis microbiano diferiram significativamente entre fumantes e desistentes em 6 e 12 meses após a cessação do

tabagismo. A comunidade microbiana em fumantes foi semelhante ao do *baseline*, enquanto os desistentes demonstraram perfis significativamente divergentes.

Estes resultados revelam um papel fundamental para a cessação do tabagismo em alterar o biofilme subgengival e sugerem um mecanismo para melhorar a saúde periodontal associados a cessação do tabagismo. Embora o consumo de cigarros apresente uma intensa influência negativa na susceptibilidade à doença periodontal, este efeito pode ser revertido e os ex-fumantes parecem comportar-se clinicamente de forma similar aos não fumantes.

Akkaya *et al*, 2006, avaliaram retrospectivamente, em 349 pacientes, as características demográficas e fatores que determinam o sucesso em uma clínica de cessação do tabagismo em fumantes que completaram um ano de acompanhamento. Ao todo, 43% pararam de fumar. Destes, 24% utilizaram medicamentos e 18% recusaram a medicação. O estudo concluiu que o nível de escolaridade maior, a terapia comportamental e motivacional intensiva, visitas de acompanhamento, telefonemas e envolvimento da família no tratamento, parecem desempenhar papéis importantes na cessação do tabagismo.

Quando os usuários do tabaco recebem uma mensagem anti-tabaco consistente de uma variedade de prestadores de cuidados de saúde, a probabilidade de sucesso na luta para sair é aumentada. A maioria das pessoas recebe muitas advertências nos meios de comunicação sobre os efeitos negativos do tabaco sobre a saúde, especialmente aquelas relacionadas com o câncer e doenças coronárias. Fumantes e usuários de tabaco sem fumaça pode não ser tão bem informados sobre as manifestações orais negativas do uso do tabaco, e higienistas dentais podem ser um instrumento para educar os pacientes sobre esses efeitos. Incluindo perguntas sobre o uso do tabaco na história da saúde é um primeiro passo vital para identificar pacientes que podem beneficiar da intervenção do aconselhamento no consultório odontológico. Uma vez identificado, o higienista pode proceder para descobrir a motivação do paciente para sair, e auxiliar no fornecimento de informações que podem ser de ajuda para o paciente em deixar a dependência do tabaco. Ajudar e encorajar os pacientes em sua batalha contra o uso do tabaco é uma forma importante que os higienistas dentais podem contribuir para a saúde da população. (Parker, 2003)

2.7 Paratormônio: Fisiologia e Mecanismo de Ação

O Hormônio da paratireóide (PTH) funciona como um importante mediador da remodelação óssea e, como um regulador primordial da homeostase do cálcio. Além dos bem-estabelecidos efeitos catabólicos do PTH, é hoje reconhecido que a administração intermitente de PTH tem efeitos anabolizantes. (Cosman & Lindsay, 1998; Liu *et al.*, 2009)

A capacidade do PTH em regular a remodelação óssea é paradoxal, podendo ora deflagar reabsorção, ora aposição óssea. Por exemplo: contínua infusão de PTH provoca uma diminuição da massa óssea, pelo aumento da atividade osteoclástica; já uma administração intermitente promove um anabolismo ósseo, por estimular diferenciação de osteoblastos (Neer *et al.*, 2001; Horwitz *et al.*, 2003).

Múltiplas ações do PTH nas células osteoblásticas interferem no processo de remodelação. O PTH modula a morfologia, proliferação, expressão protéica e gênicas destas células (Canalis *et al.*, 1989). Esses efeitos do PTH no metabolismo, acontecem por ele se ligar a um receptor (GPCR), que está presente nos osteoblastos (Swarthout *et al.*, 2001), tendo controle direto na estimulação da atividade osteoblástica, e indireto, via osteoblasto, na atividade osteoclástica. Além disso, fatores como o OPG (osteoprotegerina) e RANKL (*receptor activator of NK-KappaB ligand*) secretados pelos osteoblastos e linfócitos T, e ligados à aposição e reabsorção óssea respectivamente, sofrem uma regulação direta do PTH (Simonet *et al.*, 1997; Swarthout *et al.*, 2001).

A ação do PTH se faz diretamente sobre o osso e o rim e, indiretamente, sobre o intestino, elevando o fluxo de cálcio para a circulação. Seus efeitos biológicos conhecidos se fazem através de um receptor de membrana acoplada à proteína G, que compartilha com o *PTH related protein* (PTHrp), denominado receptor PTH/PTHrp tipo I ou PRPI (Gracitelli *et al.*, 2002)

A ativação dos osteoblastos pelo PTH resulta na expressão de genes importantes para a degradação da matriz, produção de fatores de crescimento além da estimulação e recrutamento dos osteoclastos. Seus efeitos biológicos conhecidos se fazem através de um receptor de membrana acoplado à proteína G, que estimula a adenil-ciclase elevando as concentrações de AMPc e o sistema da proteína-quinase A (PKA), enquanto que o receptor

acoplado à proteína Gq ativa a fosfolipase C, a proteína-quinase C (PKC) e o metabolismo dos inositolis-fosfatos (Goltzman, 1999). O equilíbrio entre esses dois sistemas permite o efeito biológico global do PTH.

Foi claramente comprovado que a ativação da via da adenil-ciclase (Ac) pelo PTH é essencial para a maioria das funções osteoblásticas. Embora a via da Ac/AMPC/PKA ative genes primordiais como c-fos, o sistema da PKC também tem se mostrado importante para a função osteoblástica quando o PTH é administrado de maneira intermitente (com doses diárias). Esse fato sugere que o sistema da PKC participe da transcrição protéica associada ao aumento da massa óssea com PTH intermitente, conforme observado em alguns estudos (Goltzman, 1999).

De uma forma global o PTH induz nas células estromais a expressão de genes relacionados a vários fatores de crescimento, incluindo IGF-1, IGF-2, TGF- β (*transforming growth factor beta*). Além disso, o PTH induz a produção de IGF *binding protein* (IGFBP), como IGFBP-1, -3, -4 e -5. Esses fatores de crescimento agem recrutando células pré-osteoblásticas, derivadas das células estromais da medula óssea, e induzem a diferenciação e maturação dessas em osteoblastos maduros, capazes de sintetizar colágeno em grande quantidade (Goltzman, 1999).

2.7.1 Uso Clínico do PTH (1-34)

A posição atual na medicina, quanto ao uso clínico do PTH (1-34), é que este hormônio é eficaz para o tratamento da osteoporose idiopática em homens e em mulheres com osteoporose pós-menopausa severa e fraturas ósseas induzidas por corticóide, constituindo-se na primeira terapia anabólica para tratamento destas situações clínicas. (Arq. Bras.Endocrinol Metabol, 2003). O PTH (1-34) é uma medicação com ação anabólica no osso quando administrada via subcutânea na dose de 20 μ g diariamente. Aumenta a densidade mineral óssea da coluna lombar e do fêmur, aumenta a massa óssea e a conectividade óssea. Seu efeito ósseo reduz a incidência de fraturas vertebrais e extra-vertebrais em mulheres e homens. Sua ação no tecido ósseo é preservada após a suspensão da medicação. É uma medicação segura, com frequência pequena de eventos adversos, os quais desaparecem após a descontinuação do tratamento. Apesar de sua eficácia, a

Teriparatida apresenta desvantagens, tais como, administração subcutânea diariamente, a necessidade de estocagem sob refrigeração, alto preço e o monopólio comercial. Pelo alto custo, esse medicamento vem sendo muito solicitado por via judicial às instâncias governamentais.

O paratormônio humano recombinante com 34 ou 84 aminoácidos constitui uma nova abordagem no tratamento da osteoporose, com capacidade de aumentar massa óssea e diâmetro dos ossos e restaurar a microarquitetura óssea, assim reduzindo o risco de fratura vertebrais e não-vertebrais em homens e mulheres pós-menopausa. Os melhores candidatos são aqueles com fraturas vertebrais prévias (compressivas, sintomáticas ou assintomáticas) com valores muito baixos de densidade óssea mineral ou com refratariedade ao tratamento convencional. (BODDY, 2002).

O tratamento com a Teriparatide, não deve ser realizado em pacientes com Hipercalcemia, metástases ósseas, hiperparatireoidismo, doença de Paget do Osso, níveis elevados da fosfatase alcalina sérica, hipercalcúria, urolitíase. A medicação não deve ser administrada durante a gravidez e puerpério. Dentre os eventos adversos, relatados em estudos clínicos, comparados a placebo, foram estatisticamente significantes: Náusea e câibras nas pernas.

Atualmente, comercializa-se no Brasil, Teriparatida considerado novo tratamento para osteoporose. Teriparatida, está registrada no país desde 2003. (ANVISA, 2003).

Numa revisão publicada no Clinical Evidence, por Mosekild *et al.* (2007), categorizaram-se os seguintes medicamentos como tendo benefício definido em prevenção de fraturas: alendronato, risedronato, raloxifeno, [rh PTH (1-34)].

2.7.2 Estudos que comparam o uso da Teriparatida versus Placebo, Estrógenos, Alendronato e Associações.

Em ensaio clínico randomizado e duplo-cego, Neer *et al* (2001), selecionaram 1637 mulheres pós-menopáusicas com fraturas vertebrais prévias para receber doses diárias subcutâneas de 20 ou 40 µg de [rh PTH (1-34)] ou placebo por 21 meses em média. O paratormônio diminuiu o risco de novas fraturas vertebrais (5% e 4%, respectivamente com

20 e 40 µg, *versus* 14% no grupo placebo). Novas fraturas não-vertebrais ocorreram em 6% das mulheres do grupo placebo e em 3% daquelas em cada grupo que recebeu [rh PTH (1-34)] (RR=0,47 e RR=0,46, respectivamente; IC 95%: 0,25-0,88 e 0,25-0,861).

Estudo de seguimento, Lindsay *et al*, (2004), do ensaio precedente, avaliou a incidência de novas fraturas vertebrais até 18 meses após a cessação de uso de Teriparatida. A redução do risco de fratura associada com tratamento prévio de 20 e 40 µg de Teriparatide foi 41% (p=0,004) e 45% (p=0,001), respectivamente, *versus* placebo.

Prevral S *et al*, 2009, por meio de radiografias, obtidas de pacientes do *Fracture Prevention Trail*, verificaram que o risco de fratura vertebral foi reduzido nos pacientes que receberam Teriparatida *versus* placebo, em 84% (RR=0,16, p<0,001), e que a severidade destas fraturas eram muito maiores no grupo placebo.

Estudo de seguimento de 30 meses, realizado por Kaufman *et al*,(2005), em 355 homens que haviam recebido injeções diárias de teriparatida (20 e 40 µg) ou placebo, mostrou valores de densidade óssea mineral consistentemente mais altos do que os basais. (P ≤ 0,001). Após 18 meses da suspensão do paratormônio, fratura vertebral ocorreu em 11,7% (grupo placebo), 5,4% (grupo 20 µg) e 6% (grupo 40 µg) de 279 homens. Combinando os dois grupos de teriparatida *versus* placebo, o risco de fratura vertebral diminuiu 51%, embora o resultado não seja estatisticamente significativo (NS; P=0,07). O risco de fraturas moderadas e graves reduziu-se em 83% (P=0,01).

Lindsay *et al*., (1997) realizaram um ensaio clínico randomizado, e mostraram-nos que [rh PTH (1-34)] associado a estrógeno reduziu significativamente a proporção de fraturas vertebrais em mulheres pós-menopáusicas (diagnosticadas por terem 15% de redução em comprimento vertebral) comparativamente a estrógeno isolado, após três anos: 12% no grupo [rh PTH (1-34)] mais estrógeno *versus* 41% no grupo estrógeno isolado (p=0,04).

Em estudo retrospectivo, avaliando a influência da reposição hormonal em mulheres na pós-menopausa, Minsk & Polson (1998) avaliaram 450 implantes dentais instalados em 116 mulheres com mais de 50 anos e verificaram que o hábito de fumar estava associado com um aumento significativo nas falhas observadas nesse grupo de estudo, além da terapia de reposição hormonal não ter demonstrado ser capaz de reduzir as falhas constatadas.

A terapia de reposição hormonal (TRH) da menopausa realizada com estrógenos ou estrógenos + progestógenos somente demonstrou benefício provável sobre a prevenção primária e secundária de osteoporose. O estudo *Women's Health Initiative* (2002) confirmou os resultados dos estudos observacionais que mostraram ter a terapia combinada reduzido o risco relativo de fraturas vertebrais e de quadril em 34%. Todavia, os riscos da TRH suplantam esse benefício, limitando seu uso no tratamento de osteoporose.

Em ensaio clínico randomizado e duplo-cego, realizado por Boddy *et al* (2002), um total de 146 mulheres pós-menopáusicas receberam 40 µg/dia de teriparatida por via subcutânea mais placebo oral, ou 10 mg/dia de alendronato por via oral mais placebo injetável durante 14 meses. PTH aumentou significativamente a DMO de vértebras lombares em comparação ao alendronato ($P < 0,001$). A incidência de fraturas não-vertebrais foi significativamente menor no grupo teriparatida (4,1% versus 13,7%; $p < 0,05$). Ambos os tratamentos foram bem tolerados.

Finkelstein *et al* (2006) administraram 10 mg/dia de alendronato (grupo 1), 37 µg/dia de teriparatida (grupo 2) ou ambos (grupo 3) por 30 meses a 63 homens (46-85 anos), com reduzida densidade óssea mineral em vértebra e quadril. A monoterapia com teriparatida aumentou os níveis dos marcadores de metabolismo ósseo nos primeiros seis meses, declinando até a linha de base nos 18 meses subseqüentes. No grupo 3 houve declínio nos mesmos marcadores nos primeiros seis meses, retornando aos níveis basais ou mais com a adição de teriparatida. Em outro estudo, dos mesmos pesquisadores, em 2003, o alendronato impediu os efeitos protetores de hormônio da paratireóide sobre a densidade óssea mineral em vértebras lombares e colo do fêmur.

A combinação de [rh PTH (1-34)] com estrógenos, calcitonina e bifosfonatos não tem evidenciado resultados superiores aos de teriparatida isolada sobre a redução de risco de fraturas. Em ensaio clínico, realizado por Black *et al*, (2003), onde 238 mulheres pós-menopáusicas receberam 100 µg/dia de [rh PTH (1-84)] ou 10 mg/dia de alendronato ou ambos. Ao final de 12 meses, a combinação de PTH e alendronato não foi mais eficaz do que a monoterapia com [rh PTH (1-34)] em termos de aumento de densidade óssea mineral - DMO.

2.8 Doença Periodontal Experimental em Ratos

Dentre os animais experimentais, o rato é o mais comumente utilizado, por apresentar algumas vantagens: são mais fáceis de serem manipulados, podem ser facilmente colocados sob condições “germ-free” e a destruição periodontal ocorre rapidamente. Como modelo experimental, o rato é particularmente útil em estudos de patogenicidade, estudos imunológicos e de imunização (PAGE, 1982).

Os ratos apresentam estruturas periodontais (epitélio oral, epitélio sulcular, epitélio juncional, fibras colágenas periodontais, cemento celular e acelular e osso alveolar) muito semelhantes aos humanos (PAGE, 1982). A principal diferença é que o epitélio sulcular é queratinizado, o que poderia interferir com os metabólitos do biofilme dental. Os achados clínicos e histológicos da evolução da doença periodontal em humanos são semelhantes em ratos. O tecido conjuntivo apresenta um infiltrado inflamatório contendo linfócitos T e B, macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares que migram através do epitélio para a bolsa (IRVING *et al*, 1974).

O biofilme dental, em ratos, consiste a princípio de *Streptococcus* sp. e na medida em que se torna mais espesso, com 30 dias, os gram-negativos e anaeróbios podem constituir até 25% da microbiota. Após seis meses, surgem espiroquetas, que proliferam de forma considerável (ISOGAI *et al*, 1985).

O fato de que espécies de *Actinomyces* e *Streptococcus* podem induzir perda óssea por monoinfecção em ratos indica que estes microrganismos têm um potencial periodontopatogênico importante nesses animais (BAB *et al*, 1979)

Um modelo de indução de periodontite largamente utilizado em animais consiste na colocação de ligaduras de fio de algodão ao redor dos dentes, no nível do sulco gengival (JOHNSON, 1975). Este modelo experimental é comprovadamente eficiente em acumular biofilme dental e provocar inflamação gengival (FISCHER & KLINGE, 1994).

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo se propôs avaliar, histométrica e histoquimicamente, a influência da administração intermitente do PTH (1-34), na periodontite experimental, em ratas expostas à inalação da fumaça de cigarro.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Características da amostra

Foram utilizadas 60 ratas adultas, da raça Wistar, pesando entre 300 e 400g. Destas 51 completaram o estudo, porque nove dos animais foram perdidos durante a fase do processamento histológico. Os animais provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas foram mantidos no biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, em gaiolas plásticas com acesso a ração e água *ad libitum*. Ao longo de todo o estudo, os animais foram mantidos sob as mesmas condições ambientais. Todos os procedimentos executados estavam de acordo com as normas éticas regidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa)-IB UNICAMP - (protocolo 1511-1). – Anexo 1

4.2 – Delineamento Experimental

O presente estudo foi desenvolvido com desenho experimental paralelo, em que 51 ratas foram aleatoriamente divididas em 4 grupos no início do experimento. Após 60 dias no biotério, todos os animais receberam uma ligadura de fio de algodão ao redor do primeiro molar esquerdo. O dente contra-lateral serviu com controle intra-grupo. Cada um dos grupos recebeu um tratamento experimental distinto. Sessenta dias após a indução da doença os animais foram sacrificados e os grupos comparados entre si. (Figura 1)

Grupo 1 - controle (n = 11): animais que receberam injeção subcutânea, na região dorsal, do veículo necessário para a dissolução do hormônio (0,1% de ácido acético dissolvido em água), três vezes por semana, iniciando após a colocação da ligadura, e mantendo-se até o sacrifício dos animais (por 60 dias).

Grupo 2 - Fumo (n = 15): animais que receberam inalação de fumaça de cigarro (IFC) por 60 dias prévios a colocação das ligaduras e mais 60 dias após a colocação das mesmas. Injeções subcutâneas do veículo de dissolução do hormônio (0,1% de ácido acético dissolvido em água) também foram administradas após a indução da doença

periodontal, num regime de três vezes por semana, até o sacrifício dos animais (60 dias após a colocação das ligaduras).

Grupo 3 – PTH (n=10): animais que receberam injeções subcutâneas, na região dorsal, de 40 µg/kg de PTH sintético (1-34) dissolvido em 0,1% de ácido acético, três vezes por semana, durante 60 dias após colocação das ligaduras.

Grupo 4 - Fumo + PTH (n = 15): animais que receberam injeções subcutâneas na região dorsal de 40 µg/kg de PTH sintético (1-34) dissolvido em 0,1% de ácido acético, três vezes por semana (Barros *et al.*, 2003, lida-Klein *et al.*, 2002) associado a inalação de fumaça de cigarro (IFC) por 60 dias anteriores à colocação de ligaduras e mantendo-se por 60 dias.

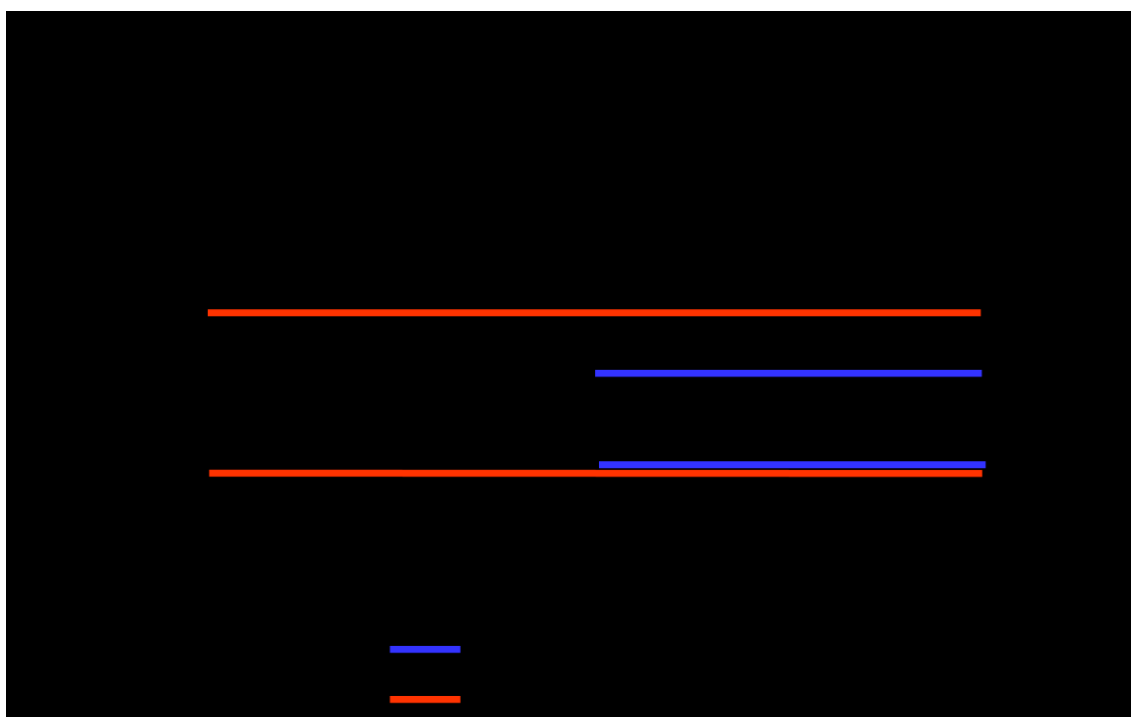


Figura 1: Representação esquemática do desenho experimental

4.3 Metodologia de Exposição à Fumaça

A metodologia utilizada para a exposição dos animais à fumaça foi descrita inicialmente por Le Mesurier *et al.* (1983) e sofreu modificações no laboratório de pneumologia da Escola Paulista de Medicina (Cendon-Filha, 1993) e por Nociti *et al.*, 2002. Em 2003, César-Neto *et al.* documentaram os níveis séricos de nicotina e cotinina promovidos por este regime de exposição à fumaça e a partir daí uma série de estudos foi realizada seguindo este modelo. Resumidamente, consiste num recipiente de acrílico (45 X25 X 20 cm³) onde os animais são temporariamente acondicionados em grupos de 5. O recipiente é composto por 2 câmaras interligadas por um orifício. Na primeira ficam armazenados os cigarros acesos. Nesta parte há também uma entrada em que o ar é bombeado, formando uma corrente que leva a fumaça para a segunda câmara, onde ficam os animais. Estes animais ficam expostos à fumaça de 10 cigarros com concentração de 1,3 mg de nicotina, 16,5 mg de alcatrão e 15,2 mg de monóxido de carbono por três períodos diários de 8 minutos. Inicialmente os animais passam por um período de adaptação de 2 dias. No primeiro dia estes ficaram expostos por períodos de 5 minutos, no segundo dia de 7 minutos e a partir do terceiro dia os animais foram expostos em 3 períodos diários de 8 minutos. Na segunda câmara há outro orifício que dá vazão ao ar bombeado. (Figura 2)

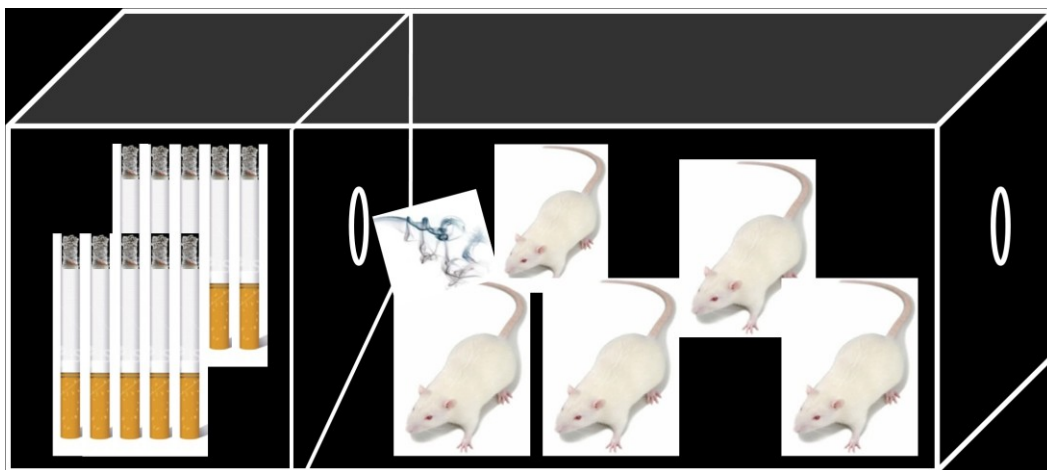


Figura 2: Desenho esquemático representando o mecanismo de exposição à fumaça. Observa-se a câmara 1 onde os cigarros eram posicionados e a câmara 2, onde os animais permaneciam durante a exposição à fumaça de cigarros.

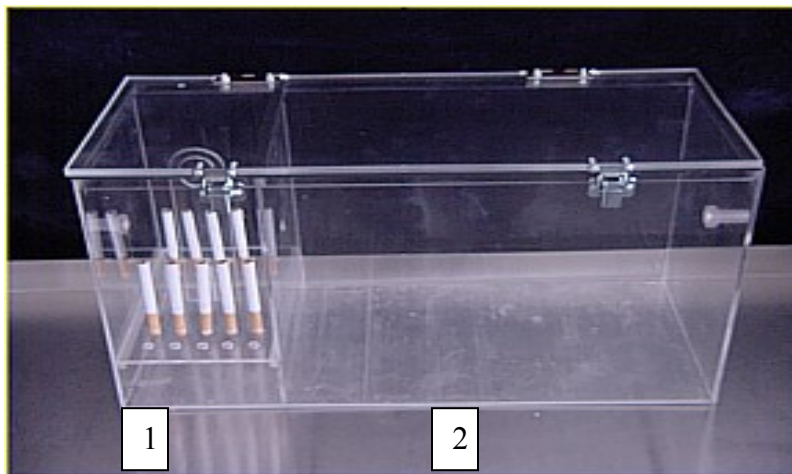


Figura 3 – Câmara de exposição à fumaça de cigarro.

4.4 - Sedação e Anestesia

Inicialmente, os animais foram pesados e de acordo com seu peso corpóreo foram anestesiados com solução de ketamina (1ml/Kg/IM) (Francotar[®]; Virbac do Brasil Industria e Comércio LTDA, Roseira, S.P., Brasil) e cloridrato de xylasina (0,3 ml/kg/IM) (Virbaxil[®]; Virbac do Brasil Industria e Comércio LTDA, Roseira, S.P., Brasil) através de injeção intramuscular no bíceps da pata direita. Nos casos em que não se obteve o efeito anestésico desejado, a dose de cloridrato de ketamina foi suplementada com metade da dose inicial, de acordo com as especificações do fabricante.

4.5 - Colocação das Ligaduras

Já anestesiados, os animais foram posicionados em aparato de Doku modificado (Doku, 1966). A cavidade bucal foi mantida aberta por meio de bandas elásticas presas aos incisivos inferiores e a língua, tracionada com o auxílio de um fio de algodão espesso (**Figura 4**). Um afastador foi utilizado para obter acesso à região dos molares do animal. Em seguida, um fio de algodão (Corrente Algodão n. 10; Coats Corrente, SP, Brasil) foi passado na região interproximal e amarrado ao redor do primeiro molar inferior esquerdo

ao nível do sulco gengival (**Figura 5 e 6**) com o objetivo de favorecer o acúmulo de biofilme nos fios. Os dentes contralaterais sem ligadura serviram de controle dentro do próprio grupo.



Figura 4 - Animal posicionado no aparelho de Doku (Doku, 1966), para melhor visualização do 1º molar inferior.



Figura 5 - Colocação do fio de algodão ao redor do 1º molar inferior esquerdo com auxílio de um espaçador endodôntico.

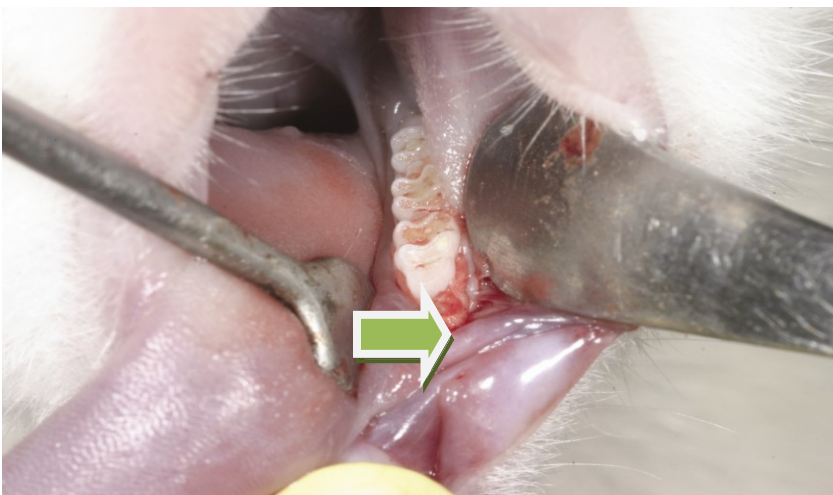


Figura 6 - Aspecto final do fio de algodão em posição (a seta indica posição do fio na mesial)

4.6 - Preparo histológico e calibração do examinador

Os animais foram submetidos à anestesia geral, como descrito anteriormente e fixados através de perfusão transcardíaca de para-formaldeído 10% em 0,1 M de tampão fosfato (pH 7,4) por aproximadamente 10 minutos cada animal. Em seguida, a mandíbula foi removida e hemi-seccionada em sua sínfise. O material obtido ficou imerso em formol a 10% com tampão fosfato (pH 7,4) por aproximadamente 24 horas. As peças foram descalcificadas em EDTA 4% por aproximadamente 16 semanas, a temperatura ambiente, sendo a solução renovada diariamente. Após a desmineralização, os espécimes foram desidratados em etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Secções longitudinais mésio-distais de 6 µm de espessura foram obtidas por auxílio de um micrótomo (Leica RM2155, Germany). Tais lâminas foram coradas em hematoxilina e eosina.

Para avaliar a calibração do examinador foi realizada, previamente às leituras finais, a correlação intra-classe. Trinta cortes foram aleatoriamente selecionados e suas medições foram feitas e repetidas após 21 dias da primeira medição. O alto valor do coeficiente correlação ($r=0,978$; IC 95%) mostra consistência na reprodutibilidade da leitura, mostrando boa calibração do examinador.

4.7 Avaliação Histométrica

Inicialmente, foram separados, para cada dente, os cortes nos quais a região da bifurcação foi claramente identificada. Foram selecionados 10 cortes, semi-seriados, de cada dente. As imagens da região inter-radicular dos cortes selecionados foram capturadas com o auxílio de uma câmera digital (Digital Kocam CCD câmera; DMI, São Paulo, Brasil) acoplada ao microscópio (Axioskop 2 plus; Zeiss, Jena, Germany) utilizando a objetiva de 5x.

A área de tecido conjuntivo proveniente da destruição do tecido ósseo na região inter-radicular foi mensurada com o auxílio de um sistema de análise de imagens

digitalizadas (Image Pro Plus, Media Cibernetics, SilverSpring, MD, EUA) utilizando o recurso de contagem de pontos de um retículo quadriculado. O retículo foi posicionado incluindo sempre a dentina coronária e radicular e o tecido ósseo, computando-se os pontos que coincidiam com o tecido conjuntivo frouxo presente na região inter-radicular em consequência da perda do osso alveolar nesta região.

4.8 Análise histoquímica

A coloração pela reação de fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico (TRAP) foi realizada para identificar e quantificar as células osteoclásticas na região de furca dos molares que receberam ligaduras. Secções seriadas com 6µm de espessura foram obtidas. Os cortes foram encubados por 2h a 37°C em câmara úmida com uma solução para detecção de Fosfatase Ácida Tartarato Resistente (Sigma), contendo: Naftol AS-BI fosfato, acetato de sódio, Fast Red Garnet GBC, Solução de Tartarato e Nitrato de Sódio. Após encubação, os cortes foram lavados em água corrente por 30 minutos e contra-corados em hematoxilina por 50 segundos. Com o auxílio de um programa para análise de imagens (Image Pro®, Media Cibernetics, Silver Spring, MD, EUA) determinou-se a concentração de células trap⁺/mm sobre o tecido ósseo adjacente a área de tecido conjuntivo associado a reabsorção óssea.

4.9 Análise Estatística

Este experimento considerou a área de perda óssea inter-radicular como variável de resposta, sendo do tipo quantitativa. Os fatores em estudo foram os diferentes tratamentos experimentais definidos anteriormente. As comparações entre os grupos foram feitas pela análise de variância (ANOVA), adotando-se um nível de significância de 5%. Teste de comparações múltiplas foram feitas pelo teste Tukey ($\alpha = 0,05$) quando houve diferenças significantes no teste ANOVA.

O número de marcações positivas para TRAP na linha de reabsorção óssea foi calculado de acordo com a quantidade de osteoclastos observados e a extensão linear da

perda óssea da área de interesse. O valor obtido foi expresso em células/mm² e os dados foram analisados por meio do teste de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas pelo teste de Dunn's. ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

A análise dos resultados histométricos deste estudo revelam que diferenças estatisticamente significantes foram observadas quando o Grupo 2 foi comparado aos grupos 1, 3 e 4 ($p < 0,05$). Já entre os grupos 1 e 4 não foram observadas diferenças significantes ($p > 0,05$). O grupo 3 diferiu estatisticamente de todos os grupos. Resultados representados pelo gráfico 1.

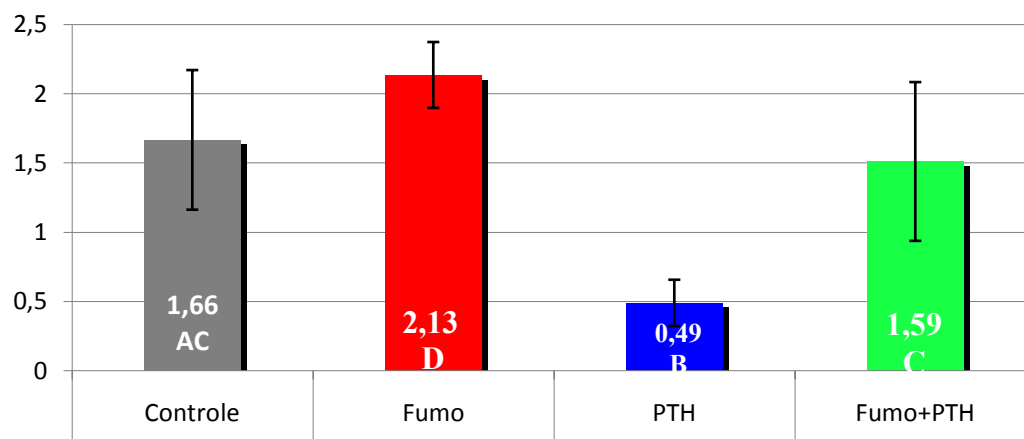
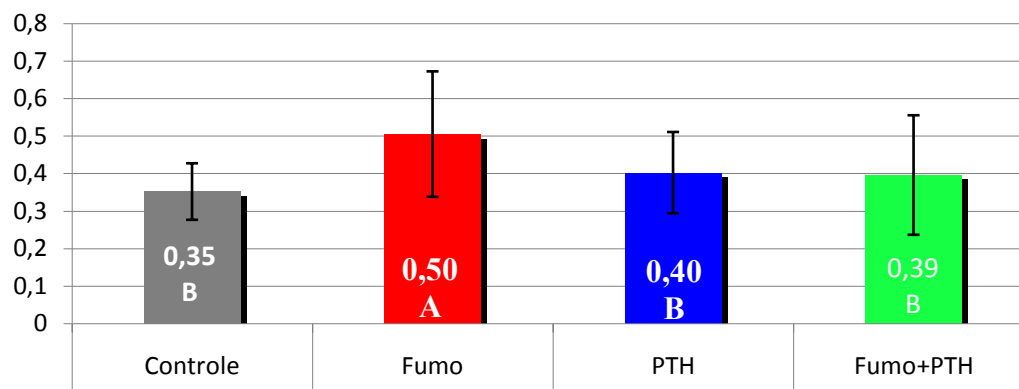


Gráfico 1: Médias e desvios-padrão da perda óssea na região das furcas (expressa em mm^2) dos dentes que receberam ligaduras. Grupo 1- controle; Grupo 2- inalação da fumaça de cigarro (IFC); Grupo 3- PTH- 1,34; IFC associado ao PTH-1,34; Grupo 4: IFC associado ao PTH-1,34. Letras distintas diferem entre si estatisticamente pela análise de variância ANOVA multifatorial e Teste Tukey ($\alpha=5\%$

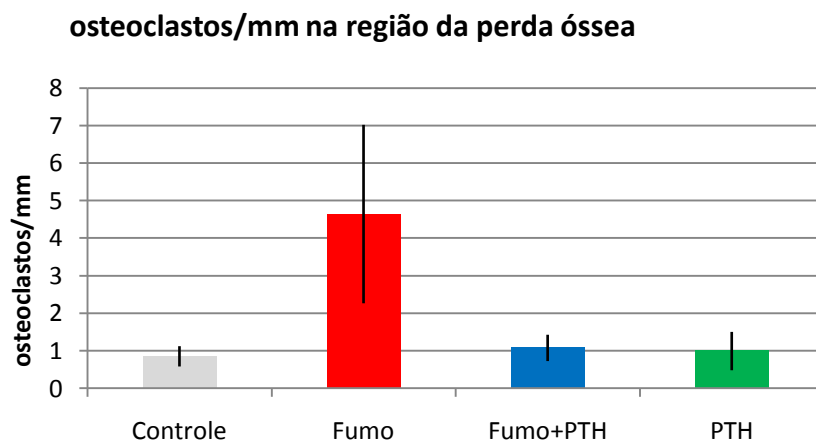
Observou-se neste estudo que, a média do grupo 2, para os animais para os dentes sem ligaduras, foi estatisticamente significativa quando comparados aos grupos 1,3 e 4 ($p \leq 0,050$). Resultados representados pelo gráfico 2.

Gráfico 2: Médias e desvios-padrão da perda óssea na região das furcas (expressa em mm²) dos dentes do grupo que não receberam ligaduras. Grupo 1- controle; Grupo 2- inalação da fumaça de cigarro (IFC); Grupo 3- PTH-1,34; Grupo 4 – IFC associado ao PTH-1,34; Letras distintas diferem entre si estatisticamente pela análise de variância ANOVA multifatorial e Teste Tukey ($\alpha=5\%$)



A reação de fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico (TRAP), mostrou que o número de osteoclastos na região de bifurcação, na análise intergrupo, foi significativamente maior no grupo 2 fumo (3,7 células por milímetros) que nos demais grupos. Entre os grupos 1, 3 e 4 não houve diferenças significativas. Gráfico 3

Gráfico 3: Média e desvio padrão do número de osteoclastos por milímetros na altura da crista óssea.



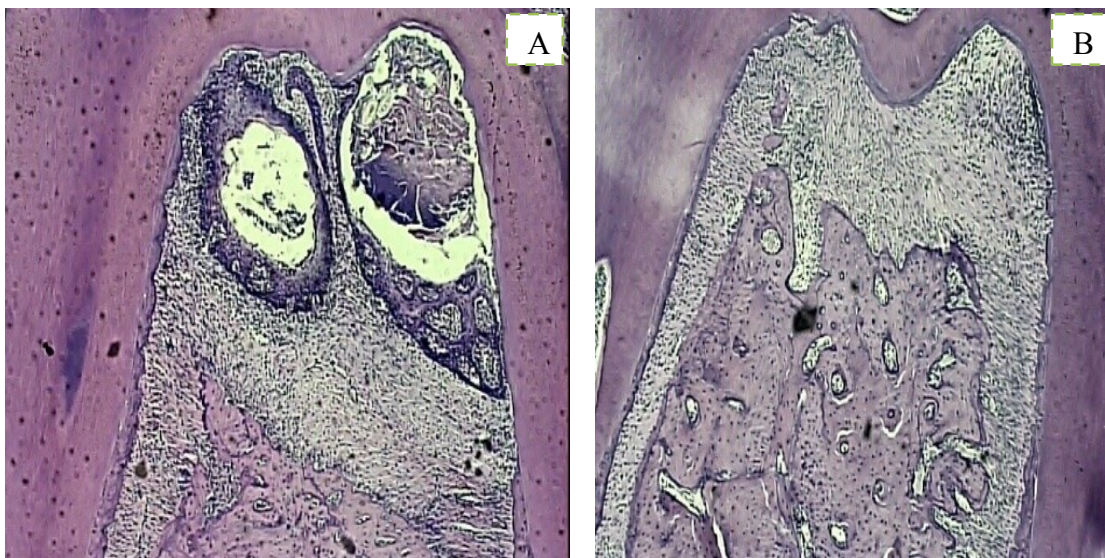


Figura 7: Ilustração histológica da região de furca dos animais que receberam ligaduras. A- Grupo 2 (IFC); B – Grupo 1 (Controle)

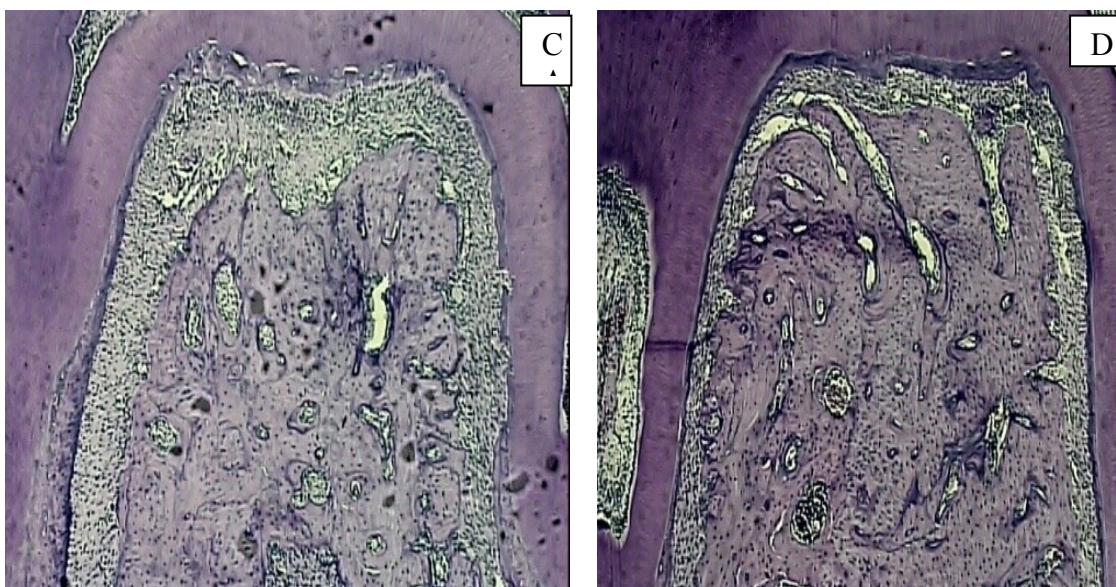


Figura 8: Ilustração histológica da região de furca dos animais que receberam ligaduras. C- Grupo 4 (IFC +PTH); D – Grupo 3 (PTH).

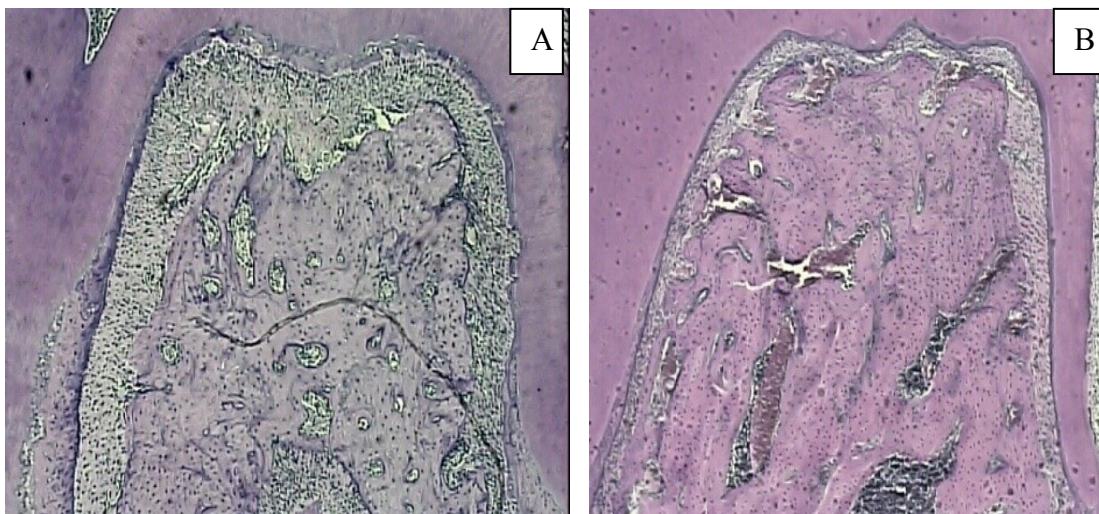


Figura 9: Ilustração histológica da região de furca dos animais que não receberam ligaduras. A- Grupo 2 (fumo); B – Grupo 1 (controle).

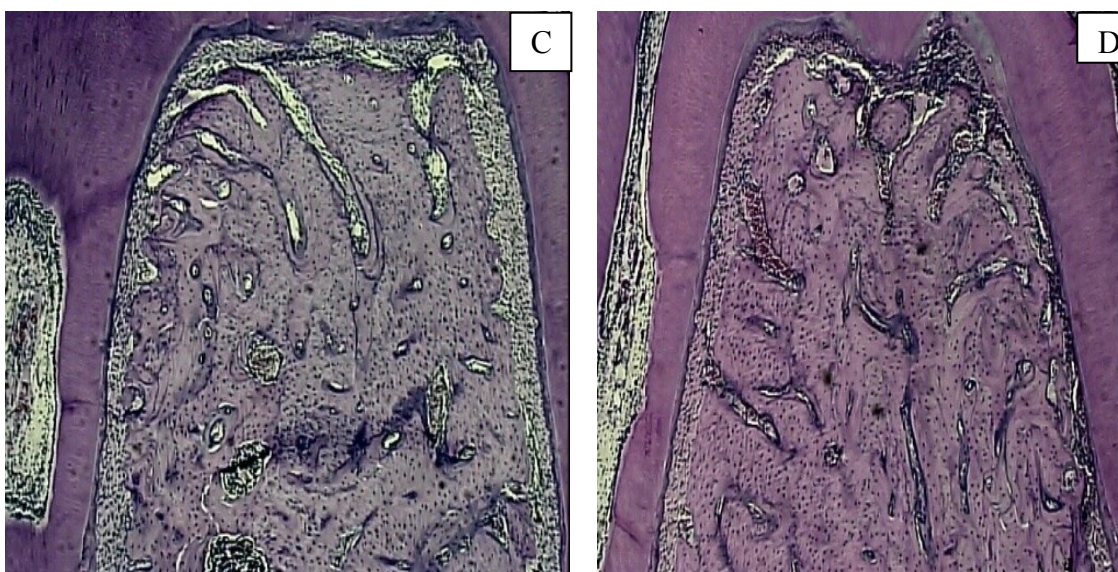


Figura 10: Ilustração histológica da região de furca dos animais que não receberam ligaduras. C- Grupo 4 (fumo + PTH); D – Grupo 3 (PTH).

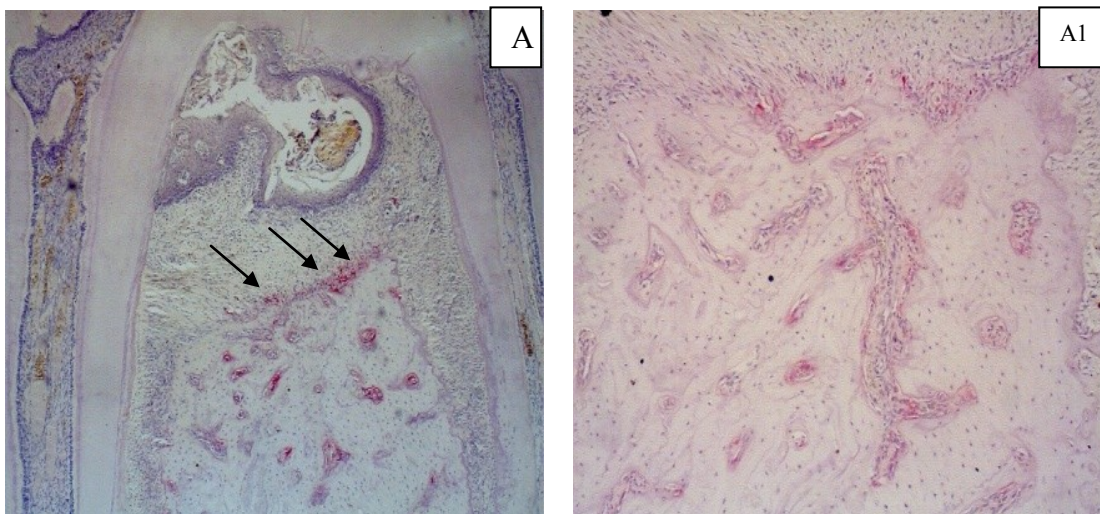


Figura 11: Fotomicrografia ilustrando detalhes de células TRAP- positivas. (Trap contracorado com Hematoxilina). A- Grupo 2 (IFC) ; A1: IFC 20x

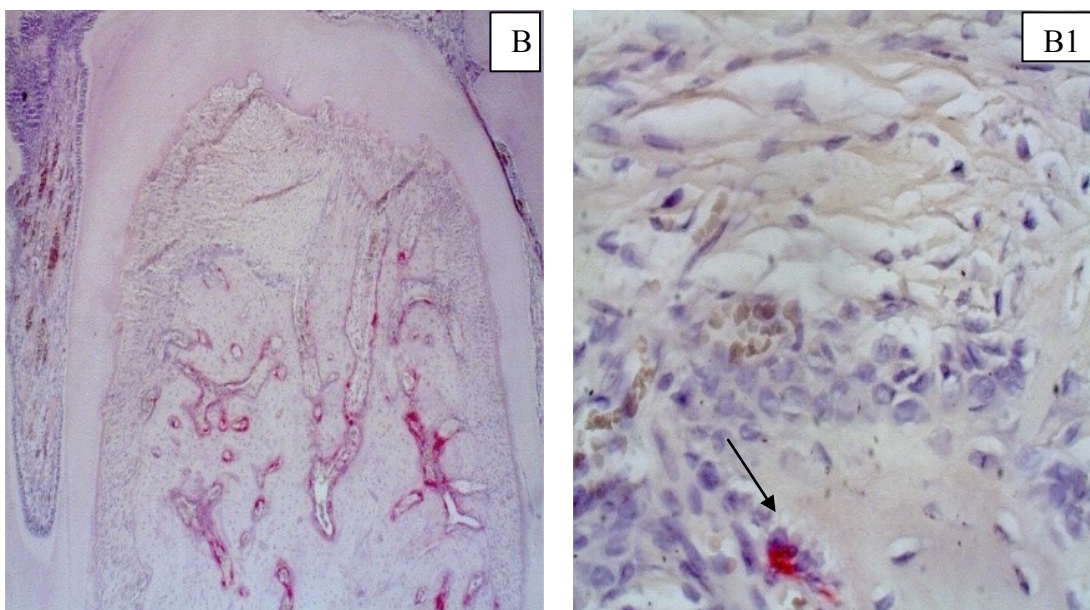


Figura 12: Fotomicrografia ilustrando detalhes de células TRAP- positivas. (Trap contracorado com Hematoxilina). B- Grupo 1 (controle) ; B1: controle 50x

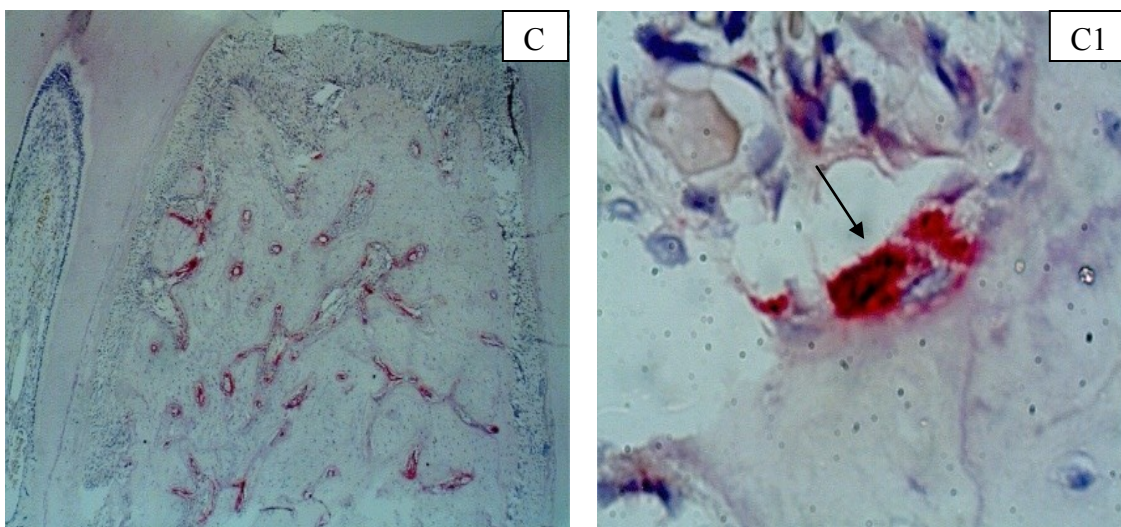


Figura 13: Fotomicrografia ilustrando detalhes de células TRAP- positivas. (Trap contracorado com Hematoxilina). C- Grupo 4 (Fumo + PTH) ; C1: Grupo 4 (Fumo + PTH 50x)

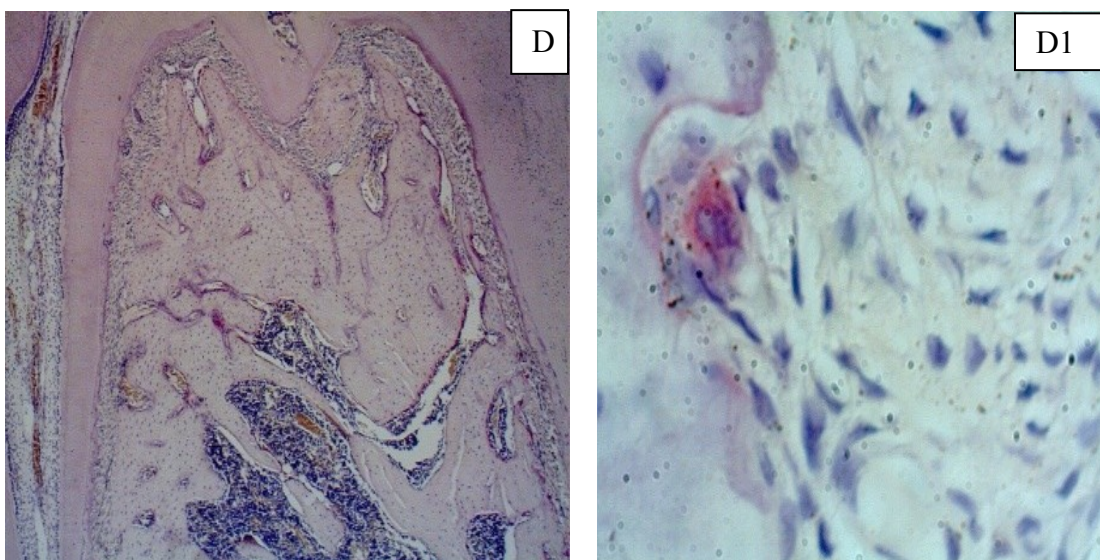


Figura 14: Fotomicrografia ilustrando detalhes de células TRAP- positivas. (Trap contracorado com Hematoxilina). D- Grupo 3 (PTH) ; D1: Grupo 3 (PTH 50x)

6 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou, por meio de métodos histológicos e de marcação celular específico para osteoclastos, o efeito da administração intermitente do PTH sintético 1-34 na doença periodontal experimental em ratas expostas a inalação da fumaça de cigarros. Os resultados do presente estudo confirmam estudos prévios (César Neto, 2005 e 2006) que afirmaram que a inalação da fumaça de cigarro (IFC) potencializa a perda óssea induzida por ligaduras em ratos. Ratifica também que a administração intermitente de PTH inibe a perda óssea neste modelo experimental (Barros *et al*, 2003; Marques *et al*, 2005). Além disso, nosso estudo foi o primeiro a demonstrar que o PTH 1-34 parece atenuar os efeitos deletérios da IFC na perda óssea induzida por ligaduras. Esta informação inédita pode, no futuro, ter um grande significado clínico no tratamento dos pacientes fumantes com periodontite.

Na presente pesquisa foi utilizado um dispositivo para expor os animais à fumaça de cigarro, semelhante ao proposto por UENG *et al*. (1997 e 1999). Entretanto, adaptações nas dimensões da câmara foram executadas com a intenção de proporcionar a colocação de 5 ratas a um só tempo (45 x 25 x 20 cm³). Foram utilizados 10 cigarros a cada exposição de 8 minutos, 3 vezes ao dia, por dois meses. Em vista disso, o volume de fumaça de cigarro inalados pelos animais parece ser similar ao teor que fumantes pesados são expostos. Todavia, os níveis plasmáticos da nicotina não foram determinados no presente estudo. Assim, uma estimativa absoluta de quantidade de fumaça absorvida pelos animais e a sua comparação com os fumantes humanos não podem ser fixadas.

Os nossos resultados indicam que a inalação da fumaça de cigarro pode resultar numa maior perda óssea na área de furca dos molares com doença periodontal induzida e uma maior espessura do ligamento periodontal na ausência de ligaduras. Entretanto, nossos resultados confirmam que quando o hormônio sintético (PTH 1-34), foi administrado intermitentemente, mesmo ocorrendo alguma perda óssea, esta foi auto-limitante com níveis comparáveis aos observados para o grupo controle.

Neste sentido, o PTH foi capaz de reduzir a perda óssea observada e proporcionar uma maior remodelação aos tecidos periodontais, atuando como um potente anabolizante nos locais com doença periodontal experimentalmente induzida.

Barros *et al*, em 2003, utilizando modelo experimental semelhante ao nosso, porém sem expor os animais a inalação da fumaça de cigarros, dividiu 20 ratos machos, em quatro grupos. Grupo 1: ligadura + PTH; Grupo 2: Controle + PTH; Grupo 3: ligadura + placebo e Grupo 4: controle + placebo. O grupo 1 não mostrou nenhuma perda óssea dentro da área de furca (0,14 mm²) quando comparados ao grupo 3 (0,13 mm²), enquanto, o grupo 3 diferiu significativamente dos demais (0, 51 mm²).

No trabalho realizado por Marques *et al*, em 2005, em trinta ratas ovariectomizadas, e que receberam doses intermitentes de PTH 1-34, indicou por meio de análise histológica que o PTH promoveu um efeito anabólico e que foi capaz de reduzir a perda óssea alveolar quando comparada a perda óssea que foi observada no grupo que recebeu veículo apenas. Ovx grupo (0.488 mm²), e Ovx grupo associado ao PTH (0.210 mm²) ($p < 0.05$).

O uso clínico do PTH está registrado no Brasil desde 2003 (ANVISA, D.O.U 20/03/2003). O interesse de cotejá-lo com outros medicamentos - relativamente a eficácia, segurança e custoefetividade – talvez prende-se à existência de um só fabricante e ao alto preço; Cada apresentação provê tratamento para um mês, por meio de injeções subcutâneas diárias. Há necessidade de estocagem sob refrigeração. Alto custo, necessidade de administração subcutânea diária e de refrigeração constituem desvantagens da terapia com Teriparatida.

Dentre os efeitos adversos, foi relatado na literatura o surgimento de osteosarcoma em ratos tratados com Teriparatida aos 19 meses de administração.(Vahle *et al*, 2002). Entretanto, as doses para ratos são de 3 a 60 vezes superiores àquelas aprovada para uso em humanos, que é de 20 mcg diários. Os efeitos adversos do uso da Teriparatida em humanos é desconhecido. Presume-se que o risco de desenvolvimento de um tumor seja de 0.4/1000 em ratos versus 0.4/100.000 em humanos. (Vahle *et al*, 2004).

Todavia há contra-indicações para o uso da Teriparatida: populações com alto risco para o desenvolvimento de osteosarcoma, doença de Paget, elevações inexplicadas da fosfatase alcalina, pacientes expostos à tratamentos com radioterapia envolvendo o

esqueleto, gravidez e puerpério, crianças e adultos jovens com epífises, nos casos de hiperparatireoidismo e hipercalcemia (File & Deal, 2009; DEF, 2008-2009). Há necessidade de estudos de maior tempo de observação para permitir conclusões sobre segurança e a persistência dos efeitos terapêuticos.

Clinicamente, o uso do PTH está indicado para o tratamento de pacientes na pós-menopausa com osteoporose e que apresentam alto risco para fratura, por exemplo: baixa densidade óssea mineral associada a fraturas recorrentes, história familiar de fraturas, uso abusivo de corticóides, etilismo, tabagismo, história de artrite reumatóide. Essas incluem pacientes com história de fratura osteoporótica ou que têm múltiplos fatores de risco para fratura, ou que falharam ou são intolerantes a prévio tratamento de osteoporose, baseados na avaliação médica. (kanis *et al*, 2008)

No tocante à doença periodontal, não há ainda estudos clínicos que utilizaram o PTH como um possível agente de neoformação óssea, porém, estudos *in vitro* (Lossdörfer *et al*, 2005) e *in vivo* (Barros *et al*, 2003; Marques *et al*, 2005), nos mostram uma direção com o possível efeito anabólico do PTH como um aliado não só no tratamento da Osteoporose como também de outras doenças ósteo-degenerativas, que é o caso das periodontites, onde a perda óssea e a conseqüente perda do dente poderia ser evitada.

Na atual pesquisa, as ratas tinham periodontite experimental induzida e potencializada pelo fumo, e vimos que na presença do hormônio PTH 1-34, a perda óssea ocorreu em níveis próximos aos valores de médias encontrados no grupo controle. Isto nos leva a questionar se a administração intermitente de PTH pode ser uma nova abordagem no tratamento das periodontites em pacientes fumantes. Obviamente, sem negligenciar que todo tratamento de restabelecimento da saúde para pacientes fumantes passa por um programa de cessação do tabagismo.

O tratamento da dependência à nicotina tem como eixo central a abordagem cognitivo-comportamental, que combina intervenções cognitivas e treinamento de habilidades comportamentais, visando a cessação e a prevenção de recaídas, podendo acrescentar a utilização de suporte medicamentoso. Quando essa abordagem é insuficiente e principalmente nos casos de elevado grau de dependência, associa-se medicamento comprovadamente eficazes. Destacam-se os não nicotínicos (antidepressivos) e os de

terapia de reposição nicotínica – TRN. (bupropiona, nortriptilina e clonidina). Esta pode ser feita, utilizando-se adesivos transdérmico, gomas de mascar, spray nasal, inalação e pastilhas, obedecendo a prescrição médica e ficando atento à posologia, efeitos colaterais e às indicações e contra-indicações de cada método. (Ministério da Saúde, 2009)

Dentre os inúmeros fatores dificultadores de cessação do tabagismo, são àqueles ligados as características próprias do indivíduo, tais como: gravidade da síndrome da abstinência, grau de dependência nicotínica, personalidade, as doenças psiquiátricas e o ganho de peso.

Resultados clínicos e histológicos prévios apontam o tabagismo como um dos principais fatores de risco para Doença Periodontal. Nociti *et al* (2000) analisaram o papel da nicotina na progressão da periodontite induzida por ligaduras em ratos. No estudo, foram utilizados 20 ratos divididos em 4 grupos, 1 controle e 3 testes que receberam as seguintes concentrações de nicotina por ml de solução fisiológica: 0,13 µl, 0,19 µl e 0,26 µl. Concluiu-se que a nicotina potencializou a progressão da doença periodontal num padrão não dose-dependente. Num estudo subsequente realizado pelo mesmo grupo de pesquisadores, em 2001, utilizaram a mesma metodologia para avaliar a influência de outras dosagens de nicotina na progressão da doença periodontal em ratos (0,37, 0,57 e 0,73 mg de nicotina/kg). Os resultados mostraram um efeito dose-dependente da nicotina sobre a progressão da doença periodontal e, além disso, observou-se que a nicotina parece ter uma ação destrutiva direta sobre os tecidos periodontais.

César-Neto *et al*, 2005 , investigaram em 53 ratos Wistar, a hipótese de que a cessação da inalação de fumaça do cigarro reverteria o impacto da qualidade óssea mandibular e da perda óssea relacionada a periodontite. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em um dos seguintes grupos: Grupo 1: Controle (n=16), sem exposição à fumaça; Grupo 2: 83 dias consecutivos de inalação de fumaça de cigarro (IFC), antes da colocação de ligaduras (n=17), e cessação da fumaça por 67 dias; Grupo 3: 90 dias de inalação de fumaça de cigarro (IFC) e 60 dias após a colocação de ligaduras (n=20), sem interrupção da fumaça. As ligaduras ficaram em posição por 60 dias antes do sacrifício dos animais. Histometricamente, uma análise intra-grupo revelou uma maior perda óssea para os dentes com ligadura quando comparados aos dentes sem ligadura. Os dentes do grupo 3

apresentaram uma maior área de perda óssea quando comparados aos grupos 1 ($0,90 \pm 0,33\text{mm}^2$) e 2 ($0,96 \pm 0,32\text{mm}^2$) ($P < 0,05$).

César-Neto *et al* 2006, investigaram em 60 ratos Wistar, por meio de histometria a influência da inalação da fumaça de cigarro e a sua cessação sobre o osso alveolar de suporte. Os animais foram distribuídos em dos seguintes grupos: Grupo 1: animais que não foram expostos a inalação da fumaça de cigarro durante todo o período experimental ($n=15$); Grupo 2: 60 dias de inalação da fumaça de cigarro ($n= 13$); Grupo 3: 90 dias de inalação de fumaça de cigarro e 60 dias sem qualquer exposição a inalação da fumaça de cigarro; Grupo 4: 150 dias de inalação da fumaça de cigarro ($n=16$). Os animais do grupo 2 e 4, que inalaram fumaça por 2 e 5 meses apresentaram uma redução significativa na proporção de tecido mineralizado quando comparados aos animais do grupo 1 e 3 (controle e cessação, respectivamente) ($p > 0,05$).

Os resultados obtidos na presente investigação apontam que o PTH 1-34 possui um efeito anabólico e que parece estimular a diferenciação dos osteoblastos. Após análise dos cortes que foram submetidos à técnica da histoquímica para marcação de Fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP), foi observado que todos os grupos apresentaram células marcadas positivamente. A expressão de osteoclastos na região de bifurcação, na análise intergrupo, foi significativamente maior no grupo 2 (3,7 mm) que no grupo 1 (0,83), grupo 4 (1,05) e grupo 3 (0,81). Foi observada uma tendência de maior número de marcações positivas para TRAP no grupo 2, isto possivelmente ocorreu por haver uma maior perda óssea nesse grupo. Observamos que o grupo 2, tinha quatro vezes mais marcações positivas para TRAP que o grupo 1, ou seja, animais fumantes apresentaram mais osteoclastos presentes na superfície óssea que animais não fumantes, portanto mais reabsorção óssea foi observada. Já o grupo 4, apresentou valores de marcações positivas para TRAP muito próximos à encontrada para o grupo 1. Nesse sentido, vamos reforçando a tese de que o hormônio PTH 1-34 diminui a reabsorção óssea pela redução da atividade osteoclástica.

A maioria das respostas anabólicas ao PTH parecem estar relacionadas com a ativação de inúmeros caminhos de sinalização intracelulares ainda desconhecidos. O PTH controla a formação e reabsorção óssea primariamente por meio da modulação do sistema OPG/RANKL/RANK. RANKL é um membro da superfamília do fator de necrose tumoral

(TNF) e é produzido pela linhagem de células osteoblásticas, pelas células do ligamento periodontal e pelos linfócitos T (Simonet *et al.*, 1997). RANKL se liga a um receptor chamado RANK localizado na superfície dos osteoclastos e nos precursores de osteoclastos (Simonet *et al.*, 1997). A ligação entre RANKL e RANK induz a osteoclastogênese, ativa os osteoclastos maduros, controla a sua inserção no osso e promove a sua sobrevivência (Simonet *et al.*, 1997). A atividade de RANKL é controlada por um receptor chamado osteoprotegerina (OPG), que é expresso numa quantidade muito maior que RANKL.

Num nível celular, OPG é expresso pelos osteoblastos, fibroblastos, células precursoras, endoteliais, dendríticas, linfóides e da musculatura aórtica (Lerner, 2004). OPG se liga a RANKL e inibe a ligação entre RANK e RANKL e conseqüentemente, a osteoclastogênese é inibida (Teitelbaum, 2000).

O presente estudo nos mostrou que o paratormônio (PTH- 1,34), mesmo na presença dos componentes da fumaça de cigarro, foi eficaz em minimizar os efeitos da perda óssea produzidos pela ligadura. Desta forma, O PTH 1-34, surge como uma possibilidade completamente nova para o tratamento da periodontite em fumantes. Clinicamente, o efeito anabólico do PTH sobre o metabolismo ósseo pode representar uma abordagem interessante para estimular formação de novo osso, e assim melhorar os resultados obtidos com a terapia periodontal. Todavia, a intenção não é abandonar o aconselhamento e o tratamento para estimular o indivíduo a parar de fumar, além dos cuidados clássicos com a prevenção e tratamento da doença periodontal.

7 CONCLUSÃO

Dentro dos limites deste estudo pode-se concluir que o uso intermitente do PTH na presença ou na ausência de inalação da fumaça de cigarros pode reduzir significativamente a perda óssea resultante da periodontite experimental.

REFERÊNCIAS*

1. Akkaya A, Ozturk O, Cobanoglu H, Bircan HA, Simsek S, Sahin U. Evaluation of patients followed up in a cigarette cessation clinic. *Respirology*. 2006 May;11(3):311-6.
2. Albandar JM, Streckfus CF, Adesanya MR et al. Cigar, pipe, and cigarette smoking as risk factors for periodontal disease and tooth loss. *J Periodontol*. 2000; 71: 1874-81.
3. American Cancer Society / UICC Building Public Awareness About Passive Smoking Hazards. [acesso 2008 Out 25]. Disponível em: http://www.paho.org/English/AD/SDE/RA/Guide1a_SecondhandSmoke.pdf
4. Andreou V, D'Addario M, Zohar R, Sukhu B, Casper RF, Ellen RP, et al. Inhibition of osteogenesis in vitro by a cigarette smoke-associated hydrocarbon combined with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide: reversal by resveratrol. *J Periodontol*. 2004 Jul;75(7):939-48.
5. Apatzidou DA, Riggio MP, Kinane DF. Impact of smoking on the clinical, microbiological and immunological parameters of adult patients with periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005 Sep;32(9):973-83.
6. Aronow WS, Poldsmith Jr, Kern JE et al. Effects of smoking on cardiovascular hemodynamics. *Arch Environ Health*. 1994. 28: 330.
7. Aspenberg P, Genant HK, Johansson T, Nino AJ, See K, Krohn K, et al. Teriparatide for Acceleration of Fracture Repair in Humans: A Prospective, Randomized, Double-blind Study of 102 Postmenopausal Women with Distal Radial Fractures. *J Bone Miner Res*. 2009 Jul 13.
8. Aurebach O, Chadwich D, Paul O et al. Relation of smoking to cardiovascular disease and peripheral vascular disease. *Chest*. 1996. 54:186.
9. Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2000 Jul 27;343(4):269-80.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos Periódicos em conformidade com o Medline.

10. Barros SP, Silva MA, Somerman MJ, Nociti FH, Jr. Parathyroid hormone protects against periodontitis-associated bone loss. *J Dent Res.* 2003 Oct;82(10):791-5.
11. Benatti BB, Cesar-Neto JB, Goncalves PF, Sallum EA, Nociti FH, Jr. Smoking affects the self-healing capacity of periodontal tissues. A histological study in the rat. *Eur J Oral Sci.* 2005 Oct;113(5):400-3.
12. Benatti BB, Nogueira-Filho GR, Diniz MC, Sallum EA, Sallum AW, Nociti FH, Jr. Stress may enhance nicotine effects on periodontal tissues. An in vivo study in rats. *J Periodontal Res.* 2003 Jun;38(3):351-3.
13. Bergström J, Eliasson S, Preber H. Cigarette smoking and periodontal bone loss. *J Periodontol.* 1991; 62: 242-46.
14. Bergstrom J. Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease. *Odontology.* 2004 Sep;92(1):1-8.
15. Black DM, Greenspan SL, Ensrud KE, Palermo L, McGowan JA, Lang TF, et al. The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med.* 2003 Sep 25;349(13):1207-15.
16. Boström L, Linder LE, Bergström J. Clinical expression of TNF-alpha in smoking-associated periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1998; 25(10): 767-73.
17. Boström L, Linder LE, Bergström J. Smoking and cervicular fluid levels of IL-6 and TNF-alpha in periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1999; 26 (6): 352-7.
18. Boyne PJ, Herford AS. Effect of tobacco smoke and transdermal nicotine on bone formation. In: 6th Abstract Book: International Congress of Preprosthetic Surgery, Palm Springs, California. 1995. Abstract n.1:1995.
19. Broulik PD, Jarab J. The effect of chronic nicotine administration on bone mineral content in mice. *Horm Metab Res.* 1993 Apr;25(4):219-21.
20. Buduneli N, Kardesler L, Isik H, Willis CS 3rd, Hawkins SI, Kinane DF, Scott DA. Effects of smoking and gingival inflammation on salivary antioxidant capacity. *J Clin Periodontol.* 2006; 33 (3): 159-64.
21. Calsina G, Ramon JM, Echeverria JJ. Effects of smoking on periodontal tissues. *J Clin Periodontol.* 2002 Aug;29(8):771-6.

22. Carnevali, S., Y. Nakamura, T. Mio, X. Liu, K. Takigawa, D. J. Romberger, J. R. Spurzem, and S. I. Rennard. Cigarette smoke extract inhibits fibroblast-mediated collagen gel contraction. *Am. J. Physiol.* 274 (Lung Cell. Mol. Physiol. 18): L591–L598, 1998.
23. Cattaneo V, Cetta G, Rota C, Vezzoni F, Rota MT, Gallanti A, et al. Volatile components of cigarette smoke: effect of acrolein and acetaldehyde on human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol.* 2000 Mar;71(3):425-32.
24. Cendon-Filha S.P. Enfisema Pulmonar: Modelo experimental em ratos expostos a fumaça do cigarro. {dissertação}. São Paulo: USP/ Escola Paulista de Medicina; 1993.
25. Centrella M, Canalis E, McCarthy TL, Stewart AF, Orloff JJ, Insogna KL. Parathyroid hormone-related protein modulates the effect of transforming growth factor-beta on deoxyribonucleic acid and collagen synthesis in fetal rat bone cells. *Endocrinology.* 1989 Jul;125(1):199-208.
26. Cesar-Neto JB, Duarte PM, Sallum EA, Barbieri D, Moreno H Jr, Nociti FH Jr. A comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. *J Periodontol.* 2003 Oct;74(10):1454-9.
27. Cesar Neto JB, de Souza AP, Barbieri D, Moreno H, Jr., Sallum EA, Nociti FH, Jr. Matrix metalloproteinase-2 may be involved with increased bone loss associated with experimental periodontitis and smoking: a study in rats. *J Periodontol.* 2004 Jul;75(7):995-1000.
28. Cesar-Neto JB, Benatti BB, Neto FH, Sallum AW, Sallum EA, Nociti FH. Smoking cessation may present a positive impact on mandibular bone quality and periodontitis-related bone loss: a study in rats. *J Periodontol.* 2005 Apr;76(4):520-5.
29. Cesar-Neto JB, Benatti BB, Sallum EA, Casati MZ, Nociti FH, Jr. The influence of cigarette smoke inhalation and its cessation on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. *J Periodontal Res.* 2006 Apr;41(2):118-23.

30. Coppe JP, Boysen M, Sun CH, Wong BJ, Kang MK, Park NH, et al. A role for fibroblasts in mediating the effects of tobacco-induced epithelial cell growth and invasion. *Mol Cancer Res.* 2008 Jul;6(7):1085-98.
31. Cosman F, Lindsay R. Is parathyroid hormone a therapeutic option for osteoporosis? A review of the clinical evidence. *Calcif Tissue Int* 1998; 62: 475-80.
32. de Heens GL, van der Velden U, Loos BG. Cigarette smoking enhances T cell activation and a Th2 immune response; an aspect of the pathophysiology in periodontal disease. *Cytokine.* 2009 Sep;47(3):157-61.
33. El-Zawawy HB, Gill CS, Wright RW, Sandell LJ. Smoking delays chondrogenesis in a mouse model of closed tibial fracture healing. *J Orthop Res.* 2006 Dec;24(12):2150-8.
34. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U et al. Biological factors contributing to failures of osseointegrates oral implants. (II) Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci.* 1998; 106: 721-764.
35. Faddy MJ, Cullinan MP, Palmer JE, Westerman B, Seymour GJ. Ante-dependence modeling in a longitudinal study of periodontal disease: the effect of age, gender, and smoking status. *J Periodontol.* 2000 Mar;71(3):454-9.
36. Fang MA, Frost PJ, Iida-Klein A, Hahn TJ. Effects of nicotine on cellular function in UMR 106-01 osteoblast-like cells. *Bone.* 1991;12(4):283-6.
37. Fielding JE, Husten CG, Eriksen MP. Tobacco: Health Effects and Control. In: Maxcy KF, Rosenau MJ, Last JM, Wallace RB, Doebbling BN (eds.). *Public Health and Preventive Medicine.* New York: McGraw-Hill. 1998; 817-845.
38. File E, Deal C. Clinical update on teriparatide. *Curr Rheumatol Rep.* 2009 Jul;11(3):169-76.
39. Fredriksson MI, Figueredo CM, Gustafsson A, Bergström KG, Asman BE. Effect of periodontitis and smoking on blood leukocytes and acute-phase proteins. *J Periodontol.* 1999; 70 (11): 1355-60.
40. Fullmer SC, Preshaw PM, Heasman PA, Kumar PS. Smoking cessation alters subgingival microbial recolonization. *J Dent Res.* 2009 Jun;88(6):524-8.

41. Fung YK, Iwaniec U, Cullen DM, Akhter MP, Haven MC, Timmins P. Long-term effects of nicotine on bone and calciotropic hormones in adult female rats. *Pharmacol Toxicol.* 1999 Oct;85(4):181-7.
42. Genco RJ. New horizons in periodontics. The challenge for diagnosis. *N Y State Dent J.* 1992 Jun-Jul;58(6):32-6.
43. Glover SJ, Eastell R, McCloskey EV, Rogers A, Garner P, Lowery J, et al. Rapid and robust response of biochemical markers of bone formation to teriparatide therapy. *Bone.* 2009 Dec;45(6):1053-8.
44. Goltzman D. Interactions of PTH and PTHrP with the PTH/PTHrP receptor and with downstream signaling pathways: exceptions that provide the rules. *J Bone Miner Res.* 1999 Feb;14(2):173-7.
45. Gracitelli MEC, Vidoris AAC, Luba R, Lazaretti-Castro M. Paratormônio e Osteoporose: Encontrando o Fio da Meada. *Bases Fisiológicas para Utilização do PTH no Tratamento da Osteoporose.* *Arq Brás Endocrinol Metab* 2002 junho;46(3):215-220.
46. Graswinckel JE, van der Velden U, van Winkelhoff AJ, Hoek FJ, Loos BG. Plasma antibody levels in periodontitis patients and controls. *J Clin Periodontol.* 2004; 31 (7): 562-8.
47. Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE, Ho AW, Koch G, Dunford R, et al. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol.* 1995 Jan;66(1):23-9.
48. Gullihorn L, Karpman R, Lippiello L. Differential effects of nicotine and smoke condensate on bone cell metabolic activity. *J Orthop Trauma.* 2005 Jan;19(1):17-22.
49. Haber J, Wattles J, Crowley M, Mandell R, Joshupura K, Kent RL. Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. *J Periodontol.* 1993 Jan;64(1):16-23.
50. Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to attachment level profiles. *J Clin Periodontol.* 2001 Apr;28(4):283-95.
51. Hanes PJ, Schuster GS, Lubas S. Binding, uptake and release of nicotine by human gingival fibroblasts. *J Periododntol* 1991; 62(1):147-152.

52. Hanioka T, Tanaka M, Ojima M, Takaya K, Matsumori Y, Shizukuishi S. Oxygen sufficiency in the gingiva of smokers and non-smokers with periodontal disease. *J Periodontol.* 2000; 71 (12): 1846-51. B
53. Hanioka T, Tanaka M, Takaya K, Matsumori Y, Shizukuishi S. Pocket oxygen tension in smokers and non-smokers with periodontal disease. *J Periodontol.* 2000; 71 (4): 550-4.
54. Harper KD, Kregge JH, Marcus R, Mitlak BH. Osteosarcoma and teriparatide? *J Bone Miner Res.* 2007 Feb;22(2):334.
55. Hashim R, Thomson WM, Pack AR. Smoking in adolescence as a predictor of early loss of periodontal attachment. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2001 Apr;29(2):130-5.
56. Haverstock BD & Mandracchia VJ. Cigarette smoking and bone healing: implications in foot and ankle surgery. *J Foot Ankle Surg.* 1998; 37 (1): 69-74; discussion 78.
57. Heasman L, Stacey F, Preshaw PM, McCracken GI, Hepburn S, Heasman PA. The effect of smoking on periodontal treatment response: a review of clinical evidence. *J Clin Periodontol.* 2006 Apr;33(4):241-53.
58. Henemyre CL, Scales DK, Hokett SD, Cuenin MF, Peacock ME, Parker MH, Brewer PD, Chuang AH. Nicotine stimulates osteoclast resorption in a porcine marrow cell model. *J Periodontol.* 2003; 74(10):1440-6.
59. Hogg JC, Timens W. The Pathology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Annu Rev Pathol.* 2008; 27. [Epub ahead of print].
60. Hollinger JO, Schmitt JM, Hwang K, Soleymani P, Buck D. Impact of nicotine on bone healing. *J Biomed Mater Res.* 1999 Jun 15;45(4):294-301. Erratum in: *J Biomed Mater Res* 1999; 46 (3): 438-9
61. Holme G. Smoking as additional risk for tooth loss. *J Periodontol.* 1994; 65: 996-1001
62. Horwitz M, Stewart A, Greenspan SL. Sequential parathyroid hormone/alendronate therapy for osteoporosis--robbing Peter to pay Paul? *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Jun;85(6):2127-8.

63. James JA, Sayers NM, Drucker DB, Hull PS. Effects of tobacco products on the attachment and growth of periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol.* 1999 May;70(5):518-25.
64. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest.* 1999 Aug;104(4):439-46.
65. Johnson GK. Tobacco use and the periodontal patient. *J Periodontol.* 1999; 70: 1419-27.
66. Jones JK, Triplett RG. The relationship of cigarette smoking to impaired intraoral wound healing: a review of evidence and implications for patient care. *J Oral Maxillofac Surg.* 1992 Mar;50(3):237-9; discussion 9-40.
67. Kamber AR, El-Ghorab N, Marzec N, Margarone JE, 3rd, Dziak R. Nicotine induced proliferation and cytokine release in osteoblastic cells. *Int J Mol Med.* 2006 Jan;17(1):121-7.
68. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Johansson H, McCloskey E. FRAX and the assessment of fracture probability in men and women from the UK. *Osteoporos Int.* 2008 Apr;19(4):385-97.
69. Kanis JA, Reginster JY. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women--what is the current message for clinical practice? *Pol Arch Med Wewn.* 2008 Oct;118(10):538-40.
70. Katono T, Kawato T, Tanabe N, Suzuki N, Yamanaka K, Oka H, et al. Nicotine treatment induces expression of matrix metalloproteinases in human osteoblastic Saos-2 cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2006 Dec;38(12):874-82.
71. Katz J, Caudle RM, Bhattacharyya I, Stewart CM, Cohen DM. Receptor for advanced glycation end product (RAGE) upregulation in human gingival fibroblasts incubated with nornicotine. *J Periodontol.* 2005 Jul;76(7):1171-4.
72. Kaufman JM, Orwoll E, Goemaere S, San Martin J, Hossain A, Dalsky GP, et al. Teriparatide effects on vertebral fractures and bone mineral density in men with osteoporosis: treatment and discontinuation of therapy. *Osteoporos Int.* 2005 May;16(5):510-6.

73. Klaassen CD. Agentes tóxicos ambientais não-metálicos. Poluentes atmosféricos, solventes e vapores e pesticidas. In: Goodman, L.S, editor. As bases farmacológicas da terapêutica. 9 ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill Interamericana; 1996. p. 1240-1257.
74. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000*. 1997 Jun;14:33-53.
75. Kupelian V, Link CL, McKinlay JB. Association between smoking, passive smoking, and erectile dysfunction: results from the Boston Area Community Health (BACH) Survey. *Eur Urol*. 2007 Aug;52(2):416-22.
76. Le Mesurier SM, Stewart BW, Lykke AW. Injury to type-2 pneumocytes in rats exposed to cigarette smoke. *Environ Res*. 1981 Feb;24(1):207-17.
77. Lee TC, Ueng SW, Chen HH, Lu K, Huang HY, Liliang PC, et al. The effect of acute smoking on spinal fusion: an experimental study among rabbits. *J Trauma*. 2005 Aug;59(2):402-8.
78. Lerner UH. New molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptor superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15(2): 64-81.
79. Iida-Klein A, Zhou H, Lu SS, Levine LR, Ducayen-Knowles M, Dempster DW. Anabolic action of parathyroid hormone is skeletal site specific at the tissue and cellular levels in mice. *J Bone Miner Res* 2002;17:808-16.
80. Liede KE, Haukka JK, Hietanen JH, Mattila MH, Rönkä H, Sorsa T. The association between smoking cessation and periodontal status and salivary proteinase levels. *J Periodontol*. 1999; 70 (11): 1361-8.
81. Lindsay R, Scheele WH, Neer R, Pohl G, Adami S, Mautalen C, et al. Sustained vertebral fracture risk reduction after withdrawal of teriparatide in postmenopausal women with osteoporosis. *Arch Intern Med*. 2004 Oct 11;164(18):2024-30.

82. Liu J, Cao Z, Li C. Intermittent PTH administration: a novel therapy method for periodontitis-associated alveolar bone loss. *Med Hypotheses*. 2009 Mar;72(3):294-6.
83. Liu XD, Zhu YK, Umino T, Spurzem JR, Romberger DJ, Wang H, et al. Cigarette smoke inhibits osteogenic differentiation and proliferation of human osteoprogenitor cells in monolayer and three-dimensional collagen gel culture. *J Lab Clin Med*. 2001 Mar;137(3):208-19.
84. Loos BG, Roos MT, Schellekens PT, van der Velden U, Miedema F. Lymphocyte numbers and function in relation to periodontitis and smoking. *J Periodontol*. 2004; 75 (4): 557-64.
85. Lossdorfer S, Gotz W, Jager A. PTH(1-34) affects osteoprotegerin production in human PDL cells in vitro. *J Dent Res*. 2005 Jul;84(7):634-8.
86. MacFarlane GD, Herzberg MC, Wolff LF, Hardie NA. Refractory periodontitis associated with abnormal polymorphonuclear leukocyte phagocytosis and cigarette smoking. *J Periodontol*. 1992 Nov;63(11):908-13.
87. Magnusson I, Low SB, McArthur WP, Marks RG, Walker CB, Maruniak J, et al. Treatment of subjects with refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1994 Oct;21(9):628-37.
88. Mariggio MA, Guida L, Laforgia A, Santacroce R, Curci E, Montemurro P, et al. Nicotine effects on polymorphonuclear cell apoptosis and lipopolysaccharide-induced monocyte functions. A possible role in periodontal disease? *J Periodontal Res*. 2001 Feb;36(1):32-9.
89. Marques MR, da Silva MA, Manzi FR, Cesar-Neto JB, Nociti FH, Jr., Barros SP. Effect of intermittent PTH administration in the periodontitis-associated bone loss in ovariectomized rats. *Arch Oral Biol*. 2005 Apr;50(4):421-9.
90. Marques MR, dos Santos MC, da Silva AF, Nociti FH, Jr., Barros SP. Parathyroid hormone administration may modulate periodontal tissue levels of interleukin-6, matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in experimental periodontitis. *J Periodontal Res*. 2009 Dec;44(6):744-50.

91. Mavropoulos A, Aars H, Brodin P. Hyperaemic response to cigarette smoking in healthy gingiva. *J Clin Periodontol.* 2003; 30 (3): 214-21.
92. Meechan JG. The effect of smoking on immediate post-extraction socket filling with blood and on the incidence of painful socket. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1998; 26: 402-409.
93. Meekin TN, Wilson RF, Scott DA, Ide M, Palmer RM. Laser Doppler flowmeter measurement of relative gingival and forehead skin blood flow in light and heavy smokers during and after smoking. *J Clin Periodontol.* 2000; 27 (4): 236-42.
94. Miki T, Nakatsuka K, Naka H, Masaki H, Imanishi Y, Ito M, et al. Effect and safety of intermittent weekly administration of human parathyroid hormone 1-34 in patients with primary osteoporosis evaluated by histomorphometry and microstructural analysis of iliac trabecular bone before and after 1 year of treatment. *J Bone Miner Metab.* 2004;22(6):569-76.
95. Millett C, Wen LM, Rissel C, Smith A, Richters J, Grulich A, et al. Smoking and erectile dysfunction: findings from a representative sample of Australian men. *Tob Control.* 2006 Apr;15(2):136-9.
96. Minsk L, Polson AM. Dental implant outcomes in postmenopausal women undergoing hormone replacement. *Compend Contin Educ Dent.* 1998 Sep;19(9):859-62, 64; quiz 66.
97. Mohan S, Kutilek S, Zhang C, Shen HG, Kodama Y, Srivastava AK, et al. Comparison of bone formation responses to parathyroid hormone(1-34), (1-31), and (2-34) in mice. *Bone.* 2000 Oct;27(4):471-8.
98. Moore D, Aveyard P, Connock M, Wang D, Fry-Smith A, Barton P. Effectiveness and safety of nicotine replacement therapy assisted reduction to stop smoking: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2009;338:b1024.
99. Morozumi T, Kubota T, Sato T, Okuda K, Yoshie H. Smoking cessation increases gingival blood flow and gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol.* 2004; 31 (4): 267-72.
100. Mosely LH, Finseth F. Cigarette smoking: impairment of digital blood flow and wound healing in the hand. *Hand.* 1977 Jun;9(2):97-101.

101. Nair P, Sutherland G, Palmer RM, Wilson RF, Scott DA. Gingival bleeding on probing increases after quitting smoking. *J Clin Periodontol*. 2003; 30 (5): 435-7.
102. Natali A, Mondaini N, Lombardi G, Del Popolo G, Rizzo M. Heavy smoking is an important risk factor for erectile dysfunction in young men. *Int J Impot Res*. 2005 May-Jun;17(3):227-30.
103. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, *et al*. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*. 2001 May 10;344(19):1434-41.
104. Nishida N, Yamamoto Y, Tanaka M, Maeda K, Kataoka K, Nakayama K *et al*. Association between passive smoking and salivary markers related to periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2006; 33 (10): 717-23. Epub 2006 Aug 3.
105. Nociti FH, Jr., Nogueira-Filho GR, Primo MT, Machado MA, Tramontina VA, Barros SP, *et al*. The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis. A histometric study in rats. *J Periodontol*. 2000 Sep;71(9):1460-4.
106. Nociti FH, Jr., Nogueira-Filho GR, Tramontina VA, Machado MA, Barros SP, Sallum EA, *et al*. Histometric evaluation of the effect of nicotine administration on periodontal breakdown: an in vivo study. *J Periodontal Res*. 2001 Dec;36(6):361-6.
107. Nociti Junior FH, Cesar Neto JB, Carvalho MD, Sallum EA, Sallum AW. Intermittent cigarette smoke inhalation may affect bone volume around titanium implants in rats. *J Periodontol*. 2002 Sep;73(9):982-7.
108. Nogueira-Filho Gda R, Rosa BT, Cesar-Neto JB, Tunes RS, Tunes Uda R. Low- and high-yield cigarette smoke inhalation potentiates bone loss during ligature-induced periodontitis. *J Periodontol*. 2007 Apr;78(4):730-5.
109. Nunn ME. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. *Periodontol 2000*. 2003;32:11-23.
110. Ockene IS, Miller NH. Cigarette smoking, cardiovascular disease, and stroke: a statement for healthcare professionals from the American Heart

- Association. American Heart Association Task Force on Risk Reduction. Circulation. 1997 Nov 4;96(9):3243-7.
111. Oda H, Matsuzaki H, Tokuhashi Y, Wakabayashi K, Uematsu Y, Iwahashi M. Degeneration of intervertebral discs due to smoking: experimental assessment in a rat-smoking model. J Orthop Sci. 2004;9(2):135-41.
 112. Osteoporosis. Curr Pharm Des. 2001; 8: 671-687.
 113. Page RC, Schroeder HE. Periodontitis'n man and other animals : a comparative review. Zurich: Jarger, 1982. p.272.
 114. Palmer RM, Scott DA, Meekin TN, Poston RN, Odell EW, Wilson RF. Potential mechanisms of susceptibility to periodontitis in tobacco smokers. J Periodontal Res. 1999; 34 (7): 363-9.
 115. Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA. Mechanisms of action of environmental factors--tobacco smoking. J Clin Periodontol. 2005; 32 Suppl 6: 180-95.
 116. Papantonopoulos GH. Smoking influences decision making in periodontal therapy: a retrospective clinical study. J Periodontol. 1999 Oct;70(10):1166-73.
 117. Parker DR. A dental hygienist's role in tobacco cessation. Int J Dent Hyg. 2003 May;1(2):105-9.
 118. Pauletto NC, Liede K, Nieminen A, Larjava H, Uitto VJ. Effect of cigarette smoking on oral elastase activity in adult periodontitis patients. J Periodontol. 2000; 71 (1): 58-62.
 119. Payne JB, Reinhardt RA, Nummikoski PV, Dunning DG, Patil KD. The association of cigarette smoking with alveolar bone loss in postmenopausal females. J Clin Periodontol. 2000 Sep;27(9):658-64.
 120. Peacock ME, Sutherland DE, Schuster GS, Brennan WA, O'Neal RB, Strong SL et al. The effect of nicotine on reproduction and attachment of human gingival fibroblasts in vitro. J Periodontol. 1993; 64 (7): 658-65.

121. Pendlebury JD, Wilson RJ, Bano S, Lumb KJ, Schneider JM, Hasan SU. Respiratory control in neonatal rats exposed to prenatal cigarette smoke. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Jun 1;177(11):1255-61.
122. Persson L, Bergstrom J, Gustafsson A, Asman B. Effect of tobacco smoking on neutrophil activity following periodontal surgery. *J Periodontol*. 2003; 74 (10): 1475-82.
123. Poggi P, Rota MT, Boratto R. The volatile fraction of cigarette smoke induces alterations in the human gingival fibroblast cytoskeleton. *J Periodontal Res*. 2002 Jun;37(3):230-5.
124. Preber H, Bergstrom J. Cigarette smoking in patients referred for periodontal treatment. *Scand J Dent Res*. 1986 Apr;94(2):102-8.
125. Prevhal S, Kregg JH, Chen P, Genant H, Black DM. Teriparatide vertebral fracture risk reduction determined by quantitative and qualitative radiographic assessment. *Curr Med Res Opin*. 2009 Apr;25(4):921-8.
126. Prugger C, Wellmann J, Heidrich J, Brand-Herrmann SM, Keil U. Cardiovascular risk factors and mortality in patients with coronary heart disease. *Eur J Epidemiol*. 2008;23(11):731-7.
127. Ramos WPB, Ramos AO. Abuso de drogas. In: SILVA, P. *Farmacologia*. 5 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p.161.
128. Ramp WK, Lenz LG, Galvin RJ. Nicotine inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity, but stimulates DNA synthesis in osteoblast-like cells. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1991 May;197(1):36-43.
129. Raulin LA, McPherson JC, 3rd, McQuade MJ, Hanson BS. The effect of nicotine on the attachment of human fibroblasts to glass and human root surfaces in vitro. *J Periodontol*. 1988 May;59(5):318-25.
130. Rennard SI, Togo S, Holz O. Cigarette smoke inhibits alveolar repair: a mechanism for the development of emphysema. *Proc Am Thorac Soc*. 2006 Nov;3(8):703-8. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Inquérito Domiciliar sobre comportamentos de risco e

- morbidade referida de doenças e agravos não transmissíveis: Brasil, 15 capitais e distrito Federal, 2002-2003. Rio de Janeiro: INCA, 2004. 186 p. [Acesso 2008 Out 30]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/inquerito/docs/completa.pdf> Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer.
131. Robbers JE, Speedie MK, Tyler VE. Alcalóides de pirina-piridina. In: Robbers JE, Speedie MK, Tyler VE, editores. Farmacognosia e Farmacobiotechnologia. São Paulo: Editorial Premier; 1997. 166- 168.
 132. Rosemberg, J. Nicotina Droga Universal, Instituto Nacional de Câncer [Acesso 2008 Out 30]. Disponível em: www.inca.gov.br, 2004.
 133. Rosen PS, Marks MH, Reynolds MA. Influence of smoking on long-term clinical results of intrabony defects treated with regenerative therapy. J Periodontol. 1996; 67 (11): 1159.
 134. Rota MT, Poggi P, Boratto R. Human gingival fibroblast cytoskeleton is a target for volatile smoke components. J Periodontol. 2001 Jun;72(6):709-13.
 135. Ryder MI. The influence of smoking on host responses in periodontal infections. Periodontol 2000. 2007; 43: 267-77.
 136. Saldanha JB, Pimentel SP, Casati MZ, Sallum AW, Sallum EA, Nociti FH. Histologic evaluation of the effect of nicotine administration on bone regeneration. A study in dogs. Braz Oral Res. 2004 Oct-Dec;18(4):345-9.
 137. Scabbia A, Cho KS, Sigurdsson TJ, Kim CK, Trombelli L. Cigarette smoking negatively affects healing response following flap debridement surgery. J Periodontol. 2001 Jan;72(1):43-9.
 138. Shea AK, Steiner M. Cigarette smoking during pregnancy. Nicotine Tob Res. 2008 Feb;10(2):267-78.
 139. Sherwin MA, Gastwirth CM. Detrimental effects of cigarette smoking on lower extremity wound healing. J Foot Surg. 1990 Jan-Feb;29(1):84-7.
 140. Shiloah J, Patters MR, Waring MB. The prevalence of pathogenic periodontal microflora in health young adult smokers. J Periodontol. 2000; 71: 562-67.

141. Silva, Marco Antonio Dias da. A Influencia da administração intermitente de hormônio paratireoideo humano fragmento (1-34) nas fibras de sharpey da face lingual do alvéolo de incisivos inferiores e na ultra-estrutura dos hepatócitos de ratos. {dissertação}. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2005.
142. Silverstein P. Smoking and wound healing. *Am J Med.* 1992 Jul 15;93(1A):22S-4S.
143. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chung R, *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89:309-319.
144. Smith MR, Kinmonth AL, Luben RN, Bingham S, Day NE, Wareham NJ, Welch A, Khaw KT. Smoking status and differential white cell count in men and women in the EPIC-Norfolk population. *Atherosclerosis.* 2003; 169 (2): 331-7.
145. Sneve M, Emaus N, Joakimsen RM, Jorde R. The association between serum parathyroid hormone and bone mineral density, and the impact of smoking: the Tromso Study. *Eur J Endocrinol.* 2008 Mar;158(3):401-9.
146. Stead LF, Perera R, Bullen C, Mant D, Lancaster T. Nicotine replacement therapy for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008(1):CD000146.
147. Stefani CM, Nogueira F, Sallum EA, de TS, Sallum AW, Nociti FH, Jr. Influence of nicotine administration on different implant surfaces: a histometric study in rabbits. *J Periodontol.* 2002 Feb;73(2):206-12.
148. Stein SH, Green BE, Scarbecz M. Augmented transforming growth factor-beta1 in gingival crevicular fluid of smokers with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2004; 75(12): 1619-26.
149. Supervia A, Nogues X, Enjuanes A, Vila J, Mellibovsky L, Serrano S, *et al.* Effect of smoking and smoking cessation on bone mass, bone remodeling, vitamin D, PTH and sex hormones. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2006 Jul-Sep;6(3):234-41.

150. Susin C, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Periodontal attachment loss attributable to cigarette smoking in an urban Brazilian population. *J Clin Periodontol*. 2004 Nov;31(11):951-8.
151. Swarthout JT, Doggett TA, Lemker JL, Partridge NC. Stimulation of extracellular signal-regulated kinases and proliferation in rat osteoblastic cells by parathyroid hormone is protein kinase C-dependent. *J Biol Chem*. 2001 Mar 9;276(10):7586-92.
152. Sweet JB, Butler DP. The relationship of smoking to localized osteitis. *J Oral Surg*. 1979; 37: 732-35.
153. Tanaka H, Tanabe N, Shoji M, Suzuki N, Katono T, Sato S, et al. Nicotine and lipopolysaccharide stimulate the formation of osteoclast-like cells by increasing macrophage colony-stimulating factor and prostaglandin E2 production by osteoblasts. *Life Sci*. 2006 Mar 6;78(15):1733-40.
154. Tanaka H, Tanabe N, Suzuki N, Shoji M, Torigoe H, Sugaya A, et al. Nicotine affects mineralized nodule formation by the human osteosarcoma cell line Saos-2. *Life Sci*. 2005 Sep 16;77(18):2273-84.
155. Tanur E, McQuade MJ, McPherson JC, Al-Hashimi IH, Rivera-Hidalgo F. Effects of nicotine on the strength of attachment of gingival fibroblasts to glass and non-diseased human root surfaces. *J Periodontol*. 2000 May;71(5):717-22.
156. Teitelbaum SL, Ross P. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nature Reviews/Genetics* 2003; 4:638-649.
157. Teughels W, Van Eldere J, van Steenberghe D, Cassiman JJ, Fives-Taylor P, Quirynen M. Influence of nicotine and cotinine on epithelial colonization by periodontopathogens. *J Periodontol*. 2005 Aug;76(8):1315-22.
158. Tipton DA, Braxton SD, Dabbous MK. Effects of a bleaching agent on human gingival fibroblasts. *J Periodontol*. 1995 Jan;66(1):7-13.
159. Tomar SL, Asma S. Smoking-attributable periodontitis in the United States: findings from NHANES III. National Health and Nutrition Examination Survey. *J Periodontol*. 2000 May;71(5):743-51.

160. Tonetti MS, Pini-Prato G, Cortellini P. Effect of cigarette smoking on periodontal healing following GTR in infrabony defects. A preliminary retrospective study. *J Clin Periodontol*. 1995 Mar;22(3):229-34.
161. Torrungruang K, Nisapakultorn K, Sutdhibhisal S, Tamsailom S, Rojanasomsith K, Vanichjakvong O, et al. The effect of cigarette smoking on the severity of periodontal disease among older Thai adults. *J Periodontol*. 2005 Apr;76(4):566-72.
162. Trikilis N, Rawlinson A, Walsh TF. Periodontal probing depth and subgingival temperature in smokers and non-smokers. *J Clin Periodontol*. 1999; 26 (1): 38-43.
163. U.S. Department of Health and Human Services. The Health Consequences of Smoking: A Report of the Surgeon General. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, 2004. [Acesso 2008 Out 30]. Available from: http://www.cdc.gov/tobacco/data_statistics/sgr/sgr_2004/index.htm.
164. U.S. Department of Health and Human Services. Tobacco Use Among U.S. Racial/Ethnic Minority Groups — African Americans, American Indians and Alaska Natives, Asian Americans and Pacific Islanders, and Hispanics: A Report of the Surgeon General. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 1998 [Acesso 2008 Out 30]. Available from: http://www.cdc.gov/tobacco/data_statistics/sgr/sgr_1998/index.htm.
165. Ueng SW, Lee MY, Li AF, Lin SS, Tai CL, Shih CH. Effect of intermittent cigarette smoke inhalation on tibial lengthening: experimental study on rabbits. *J Trauma*. 1997; 42 (2): 231-8.
166. Ueng SW, Lee SS, Lin SS, Wang CR, Liu SJ, Tai CL, et al. Hyperbaric oxygen therapy mitigates the adverse effect of cigarette smoking on the bone healing of tibial lengthening: an experimental study on rabbits. *J Trauma*. 1999 Oct;47(4):752-9.

167. Vahle JL, Sato M, Long GG, Young JK, Francis PC, Engelhardt JA, et al. Skeletal changes in rats given daily subcutaneous injections of recombinant human parathyroid hormone (1-34) for 2 years and relevance to human safety. *Toxicol Pathol.* 2002 May-Jun;30(3):312-21.
168. van der Weijden GA, de Slegte C, Timmerman MF, van der Velden U. Periodontitis in smokers and non-smokers: intra-oral distribution of pockets. *J Clin Periodontol.* 2001 Oct;28(10):955-60.
169. Van Dyke TE, Sheilesh D. Risk factors for periodontitis. *J Int Acad Periodontol.* 2005 Jan;7(1):3-7.
170. Wan CP, Leung WK, Wong MC, Wong RM, Wan P, Lo EC, et al. Effects of smoking on healing response to non-surgical periodontal therapy: a multilevel modelling analysis. *J Clin Periodontol.* 2009 Mar;36(3):229-39.
171. Wang H, Liu X, Umino T, Kohyama T, Zhu YK, Wen FQ, et al. Effect of cigarette smoke on fibroblast-mediated gel contraction is dependent on cell density. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003 Jan;284(1):L205-13.
172. Yamamoto Y, Nishida N, Tanaka M, Hayashi N, Matsuse R, Nakayama K, et al. Association between passive and active smoking evaluated by salivary cotinine and periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005 Oct;32(10):1041-6.
173. Yuhara S, Kasagi S, Inoue A, Otsuka E, Hirose S, Hagiwara H. Effects of nicotine on cultured cells suggest that it can influence the formation and resorption of bone. *Eur J Pharmacol.* 1999 Nov 3;383(3):387-93.
174. Zitzmann NU, Staehelin K, Walls AW, Menghini G, Weiger R, Zemp Stutz E. Changes in oral health over a 10-yr period in Switzerland. *Eur J Oral Sci.* 2008 Feb;116(1):52-9.

ANEXO



CEEAA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEAA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1511-1, sobre "Efeito do PTH sintético (1-34) sobre o tecido ósseo ao redor de ligaduras inseridos em ratas expostas à fumaça de cigarro", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Enilson Antônio Sallum / Ezymar Gomes Cayana, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEAA/Unicamp em 28 de abril de 2008.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1511-1, entitled "Effect of synthetic PTH (1-34) on bone tissue around ligatures in ratsexposed to cigarette smoking inhalation", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on April 28, 2008.

Campinas, 28 de abril de 2008.

Profa. Dra. Ana Aparecida Guaraldo
Presidente

Fátima-Alonso
Secretária Executiva

CEEAA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>